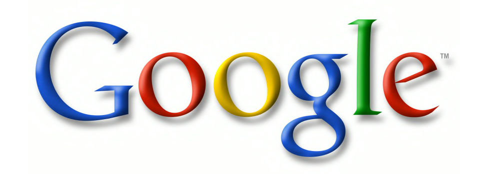
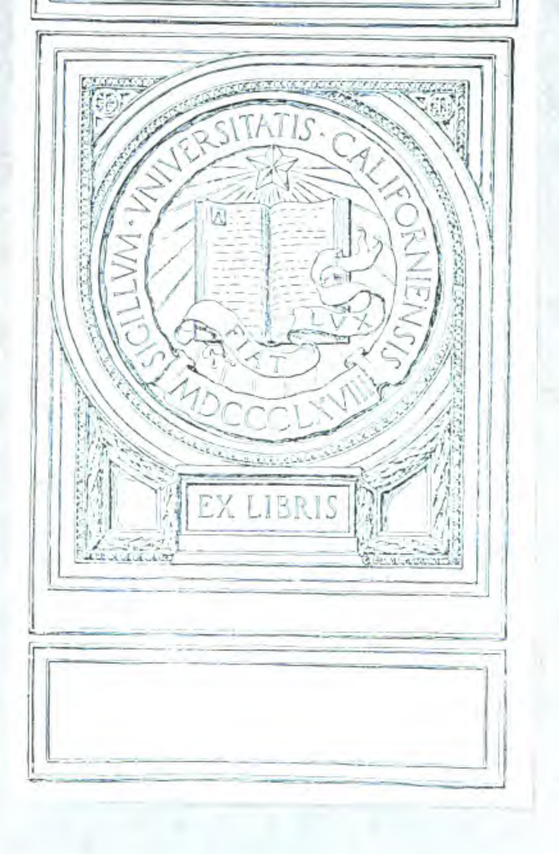
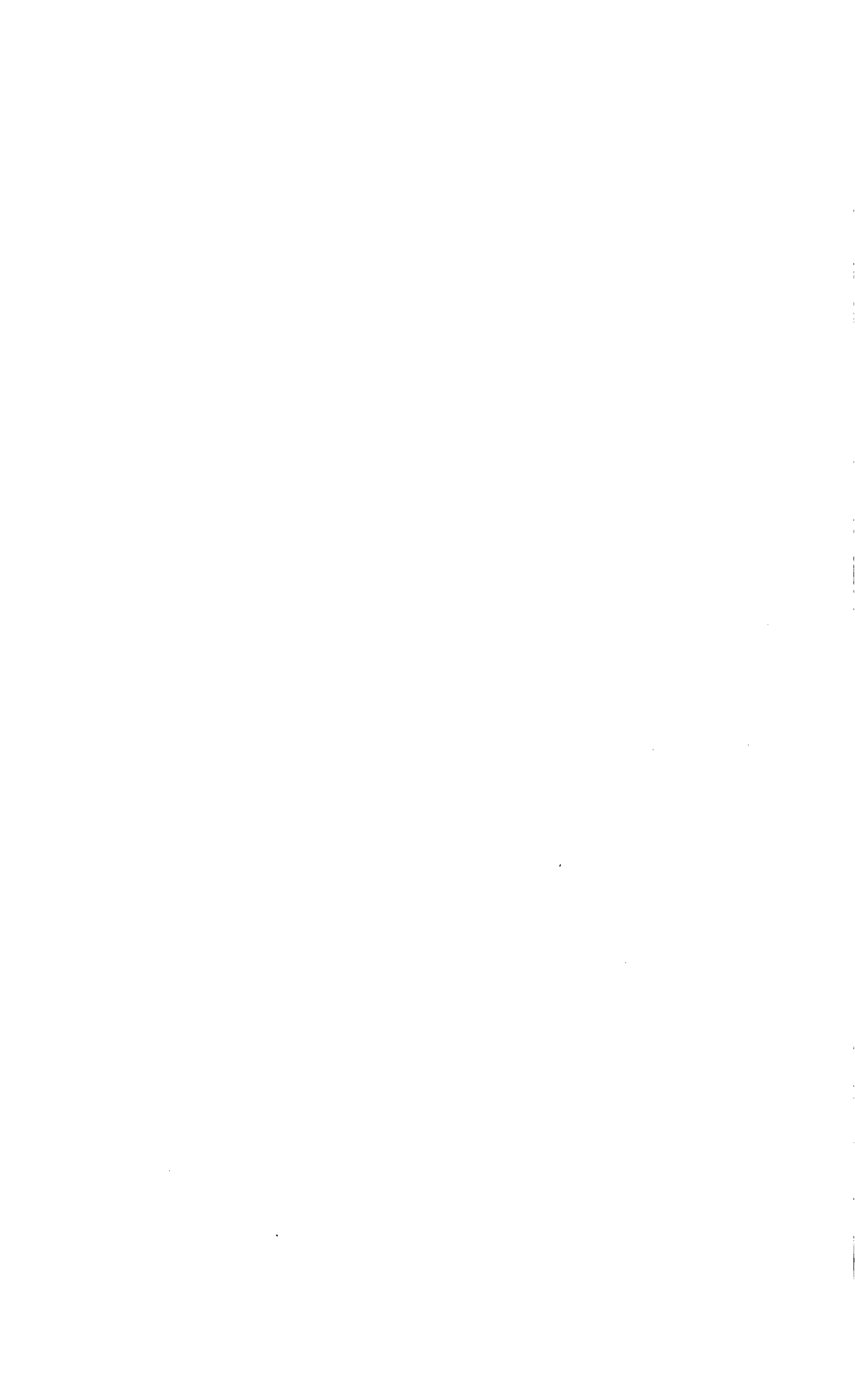
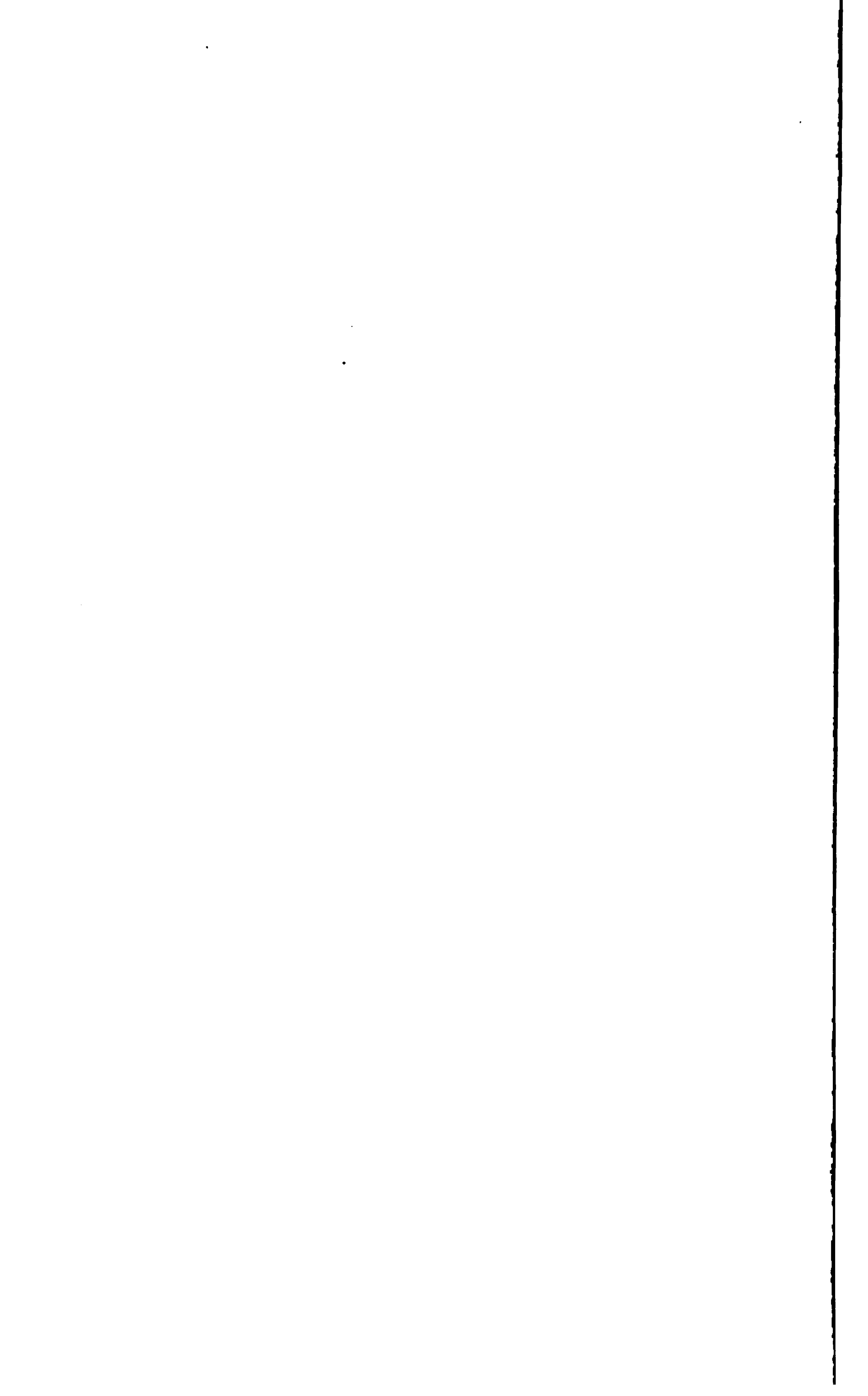
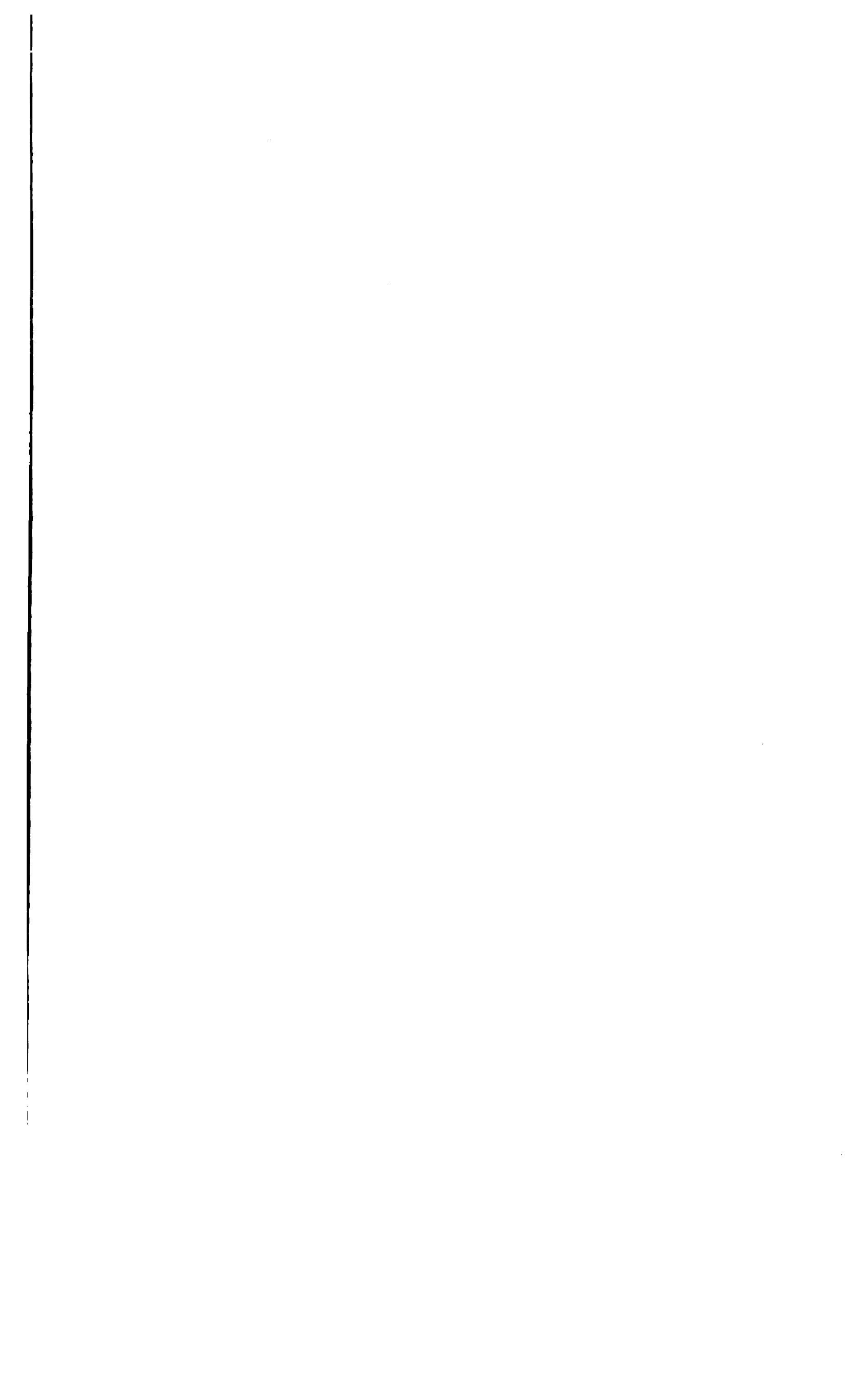





SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS









ZEITSCHRIFT

für

PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

Prof. E. BAUMANN in Freiburg, Prof. GÄHTGENS in Giessen, Prof. O. HAMMARSTEN in Upsala, Prof. HÜFNER in Tübingen, Prof. HUPPERT in Prag, Prof. JAFFE in Königsberg, Prof. A. KOSSEL in Berlin, Prof. E. LUDWIG in Wien und Prof. E. SCHULZE in Zürich

herausgegeben von

F. HOPPE-SEYLER,

Professor der physiologischen Chemie an der Universität Strassburg

ACHTZEHNTER BAND.

STRASSBURG

VERLAG VON KARL J. TRÜBNER

1894.

Inhalt des achtzehnten Bandes.

Heft I.

Seite

Araki, T. Beiträge zur Kenntniss der β-Oxybuttersäure und ihres Verhaltens im Organismus 1
Mörner, Carl Th. Zur Frage über die Wirkungsart der Eisenmittel 13
Gmelin, Bernhard. Beitrag zur Kenntniss des Leucins 21
Winterstein, E. Zur Kenntniss der Thiercellulose oder des Tunicins 43
Inoko, Y. Einige Bemerkungen über phosphorhaltige Blutfarbstoffe 57
Mörner, Carl Th. Untersuchung der Proteïnsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges I. 60
Wulff, Carl. Nachträgliche Bemerkungen zu meiner Abhandlung «Zum Nachweis der Harnsäure in den Organen» 107

Heft II.

Weiske, H. Zur Frage über den Einfluss einmaliger oder fractionirter Aufnahme der Nahrung auf die Ausnützung derselben . . 109
Cohn, Rudolf. Ueber das Verhalten einiger Pyridin- nnd Naphthalinderivate im thierischen Stoffwechsel 112
Schultz-Schultzenstein, C. Versuche über den Einfluss von Caffee- und Thee-Abkochungen auf künstliche Verdauung . 131
Cohn, Rudolf. Ueber einen in den thierischen Geweben sich vollziehenden Reductionsprocess 133
Huppert. Ueber die specifische Drehung des Glykogens . . . 137
— Ueber das Vorkommen von Glykogen in Blut und Eiter . 144
Krauss, Ernst. Ueber die Ausnützung der Eiweissstoffe in der Nahrung in ihrer Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Nahrungsmittel 167
Hildebrandt, H. Zur Frage nach dem Nährwerth der Albumosen 180
Baisch, Karl. Ueber die Natur der Kohlehydrate des normalen Harns. (I. Mittheilung.) 193
Salomon, Georg. Weitere Untersuchungen über die Xanthinkörper des Harns 207

Heft III und IV.

Mörner, Carl Th. Untersuchung der Proteïnsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. II.. 213
— Untersuchung der Proteïnsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. III. 233

Seite

Gabriel, S. Chemische Untersuchungen über die Mineralstoffe der Knochen und Zähne 257

Embden, Heinrich. Beiträge zur Kenntniss der Alkaptonurie. II. Mittheilung 304

Horbaczewski, J. Analyse zweier seltener Harnsteine 335

— Ueber die Trennung der Harnsäure von den Xanthinbasen 341

Krüger, Martin. Ueber die Fällbarkeit der Harnsäure und der Basen der Harnsäuregruppe als Kupferoxydulverbindungen 351

Dreyfuss, Isidor. Ueber das Vorkommen von Cellulose in Bacillen, Schimmel- und anderen Pilzen 358

Stadelmann, E. Ueber das Vorkommen von Gallensäuren, Hippursäure und Benzoësäure in den Nebennieren 380

Heft V und VI.

Kelling, G. Ueber Rhodan im Mageninhalt, zugleich ein Beitrag zum Uffelmann'schen Milchsäure-Reagens und zur Prüfung auf Fettsäuren 397

Kemmerich, E. Studien über das Südamerikanische Fleischextract und Fleischpepton 409

Krüger, Martin. Zur Kenntniss des Adenins und Hypoxanthins. III. Mittheilung 423

— Die Constitution des Adenins und Hypoxanthins. IV. Mittheilung 423

Lilienfeld, Leon. Zur Chemie der Leucocyten 473

Schwarz, Hugo. Untersuchungen über die chemische Beschaffenheit der elastischen Substanz der Aorta 487

Gumlich. Ueber die Aufnahme der Nucleïne in den thierischen Organismus 508

Boruttau, Heinrich. Vergleichende Untersuchungen über den Chemismus im Herz- und Körpermuskel 513

Mörner, Carl Th. Ueber die im Hühnereiweiss in reichlicher Menge vorkommende Mucinsubstanz 525

Popoff, P. M. Ueber die Einwirkung von eiweissverdauenden Fermenten auf die Nucleïnstoffe 533

Inoko, Yoshito. Ueber die Verbreitung der Nucleïnbasen in den thierischen Organen. (Mitgetheilt von A. Kossel) . . . 540

Jolles, Adolf. Ueber den Nachweis von Gallenfarbstoffen im Harne 545

Beiträge zur Kenntniss der β-Oxybuttersäure und ihres Verhaltens im Organismus.

Von

Dr. T. Araki.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg.)

(Der Redaction zugegangen im Februar 1893.)

Bekanntlich ist das Auftreten von β-Oxybuttersäure im Harn häufig bei Diabetiker, aber zuweilen bei anderen Krankheiten, nie im normalen Zustande beobachtet. Die Ursachen der Bildung und der Ausscheidung dieser Säure sind noch nicht aufgeklärt, wenn aber eine solche fette Säure im Harne erscheint, liegt der Gedanke nahe, dass eine Störung in der Harnsecretion und zwar ein Mangel an Sauerstoff in der Niere, wenn auch nicht als die einzige Ursache, doch als ein nicht unwichtiges Moment für diese pathologische Erscheinung aufzufassen sei.

Ausgehend von dieser Ansicht, habe ich die im Folgenden zu schildernden Versuche angestellt. Einige vorbereitenden Arbeiten mussten zunächst über gewisse Eigenschaften der β-Oxybuttersäure ausgeführt werden, welche 1) die Zerlegung dieser Säure bei der Destillation ihrer wässerigen Lösung; 2) ihre Zersetzung durch Fäulnissgährung; 3) ihre Trennung von Milchsäure und Bestimmung beider Säuren nebeneinander betreffen.

Da mir die im Organismus entstandene optisch active (linksdrehende) Säure nicht zu Gebote stand, habe ich zu den folgenden Versuchen die Säure angewendet, welche nach dem bekannten Verfahren von Wislicenus, Reduktion des Acetessigesters mit Natriumamalgam, von mir dargestellt war.

I. Zersetzung von β-Oxybuttersäure bei der Destillation ihrer wässerigen Lösung.

Im ersten Versuche wurden 2 gr. freier β-Oxybuttersäure in 200 cbcm. Wasser aufgelöst und im Oelbade der Destillation unterworfen, das Destillat in 3 Fractionen aufgefangen, mit Zinkcarbonat einzeln gesättigt, die Quantitäten des crotonsauren Zinks bestimmt.

Fraction 1. 100 cbcm. enthielten 0,022 gr. crotons. Zn. = 0,019 gr. freier β-Oxybutters.
» 2. 80 cbcm. enthielten 0,013 gr. crotons. Zn. = 0,011 gr. freier β-Oxybutters.
» 3. 13 cbcm. enthielten 0,242 gr. crotons. Zn. = 0,214 gr. freier β-Oxybutters.

Der Rückstand im Kolben erstarrte als braune Masse.

Im zweiten Versuche wurde in gleicher Weise verfahren, mit 1,87 gr. β-Oxybuttersäure gelöst in 187 cbcm. Wasser und im Oelbade destillirt.

Fraction 1. 94 cbcm. enthielten 0,018 gr. crotons. Zn. = 0,015 gr. freier β-Oxybutters.
» 2. 75 cbcm. enthielten 0,012 gr. crotons. Zn. = 0,010 gr. freier β-Oxybutters.
» 3. 12 cbcm. enthielten 0,301 gr. crotons. Zn. = 0,266 gr. freier β-Oxybutters.

Der Rückstand erstarrte als braune Masse.

Im dritten Versuche wurde 1,25 gr. α-Crotonsäure in 125 cbcm. Wasser aufgelöst und die Lösung der Destillation unterworfen, im Destillate die Säure mit Barytwasser neutralisirt.

Fraction 1. 50 cbcm. gab 0,973 gr. crotons. Baryum = 0,545 gr. freier Crotonsäure.
» 2. 25 cbcm. gab 0,819 gr. crotons. Baryum = 0,458 gr. freier Crotonsäure.

Der Rückstand gab noch 0,41 gr. crotons. Baryum.

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, dass die α-Crotonsäure mit den Wasserdämpfen reichlicher überdestillirt, als die β-Oxybuttersäure, dass aber schon bei der Destillation einer 1 procentigen wässerigen Lösung der letzteren Säure

bis auf die Hälfte ihres Volumen (wobei sie also kaum 2procentig geworden ist) ein geringer Theil in Crotonsäure umgewandelt wird und als solche überdestillirt. Die Quantität der zerlegten überdestillirenden Säure bleibt immerhin gering, bis die Lösung die Concentration von 10 % β-Oxybuttersäuregehalt erreicht hat, von da ab geht viel von der Säure über. Da die Crotonsäure schon bei geringerer Concentration reichlich übergeht, ist es nicht zweifelhaft, dass die Spaltung der β-Oxybuttersäure erst bei ziemlich hoher Concentration und Temperatur reichlicher eintritt.

II. Ueber die Fäulniss-Gährung der β-Oxybuttersäure.

Da Calciumsalze bekanntlich für Gährungsversuche sich besonders geeignet erwiesen haben, so wurde das gewonnene Natriumsalz in Calciumverbindung umgewandelt.

Was die Infizirung betrifft, so bediente ich mich einer gefaulten 1 procentigen Peptonlösung, welche ein wenig Kaliumphosphat enthielt, mit einem Tropfen von Schlamm versetzt und 3 Tage lang im Wasserbad bei 38—40° C. gehalten war.

Am 18. Juni 1892 wurden 7,597 gr. β-oxybuttersaures Calcium in 200 cbcm. Wasser aufgelöst, in einen Kolben gebracht, mit 10 gr. Calciumcarbonat versetzt und dann einmal zum Sieden erhitzt. Nachdem die Lösung vollkommen abgekühlt und 10 cbcm. Peptonlösung mittelst eines Trichters in den Kolben zugegossen war, wurde der Kolben in der Weise zugeschmolzen, dass dessen Hals, zu einem engen Rohr ausgezogen, passend gebogen war und mit der Mündung unter Quecksilber stand, um entwickelte Gase genau in mit Quecksilber gefüllten Röhren auffangen zu können.

Die Gährung fand vom 18. Juni bis 22. Oktober bei 16—28° C. statt und da am 22. Oktober die Temperatur unter 12° C. gesunken war, und die Gasentwickelung aufhörte, so wurde der Kolben in ein grosses Wasserbad gestellt, dessen Temperatur mittelst eines Thermoregulators auf 26° C. eingestellt war.

Zur Controle wurden 7,787 gr. β-oxybuttersaures Calcium in 200 cbcm. Wasser aufgelöst und unter denselben Be-

dingungen der Fäulniss überlassen. Diese Portion war stets mit Nr. II bezeichnet, um Verwechselung mit Nr. I zu vermeiden.

Die Zusammensetzung der aufgefangenen Gase zeigt folgende Zusammenstellung:

Nr. I.

1. Portion.	CO_2	53,25	Volum-Procent,
	H_2	2,88	»
	N_2	43,87	»
2. Portion.	CO_2	60,89	»
	CH_4	9,52	»
	H_2	3,36	»
	N_2	26,23	»
3. Portion.	CO_2	63,22	»

Im Uebrigen verunglückt.

Nr. II.

1. Portion.	CO_2	29,24	Volum-Procent,
2. Portion,	CO_2	62,92	»

In dem vereinigten von CO_2 befreiten Gasgemische von Portion 1 und 2 gefunden:

	H_2	28,62	Volum-Procent,
3. Portion.	CO_2	69,41	»
	CH_4	30,59	»
4. Portion.	CO_2	73,01	»
	CH_4	26,11	»
	N_2	0,88	»

Die Analysen dieser Gase wurden nach den Methoden von Bunsen (Gasometrische Methoden, 2. Aufl.) ausgeführt, die CO_2 mit Natronlauge absorbirt, H_2 und CH_4 durch Explosion mit Sauerstoff und elektrolytischen Knallgas bestimmt.

Am 8. November wurden die beiden Kolben geöffnet, die vergohrenen Flüssigkeiten in Porzellanschalen ausgegossen und auf dem Wasserbade eingedampft. Die getrocknete Masse wurde wieder in Wasser aufgelöst, einige Minuten auf dem Wasserbade erhitzt und dann heiss filtrirt, wobei Calciumcarbonat auf dem Filter zurückblieb, während Calciumverbindungen der Fettsäuren mit noch nicht zersetztem β-oxybuttersaurem Calcium ins Filtrat übergingen. Leider versäumte ich, die gesammten, in heissem Wasser löslichen Calciumsalze abzuwägen

Die Calciumverbindungen von Nr. I wurden nach dem Ansäuren mit verdünnter Schwefelsäure mehrmals mit Aether geschüttelt; nach vorsichtiger Destillation des Aethers wurde der Rückstand in Wasser aufgelöst und im Sandbade bei 120—130° C. der Destillation unterworfen. Das Destillat wurde mit Barytwasser schwach alkalisch gemacht, durch Durchleiten von CO_2, Auskochen und Filtriren von überschüssigem Baryum befreit und auf dem Wasserbade eingeengt. Da es nicht möglich war, durch fractionirte Krystallisation der Baryumsalze die Säuren von einander zu trennen, so wurden die Baryumsalze in Wasser aufgelöst und durch fractionirte Fällung mit concentrirter Silbernitratlösung in Silbersatze verwandelt.

Der Rückstand wurde in ein wenig Wasser aufgelöst und durch Kochen mit Zinkcarbonat, Filtriren und Abdampfen auf dem Wasserbade in Zinksalze übergeführt.

Die Calciumverbindungen Nr. II wurden zuerst nach dem Zusatze von verdünnter Schwefelsäure von gebildetem Gyps abfiltrirt, mit Wasser gut ausgewaschen und dann der Destillation unterworfen. Das Destillat wurde genau so behandelt wie Nr. I; aus dem Rückstande wurden die freien Säuren durch Schütteln mit Aether extrahirt und deren Zinksalze nach dem Abdestilliren des Aethers durch Kochen mit Zinkcarbonat, Filtriren und Verdunsten auf dem Wasserbade dargestellt.

Die Resultate der ausgeführten Silberbestimmungen sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Nr. I.

1. Fällung. 0,3925 gr. Subst. gaben 0,2300 gr. Ag = 58,59 % Ag.
2. Fällung. 0,3400 gr. Subst. gaben 0,2030 gr. Ag. = 59,70 % Ag.
3. Fällung. 0,3470 gr. Subst. gaben 0,2180 gr. Ag = 62,83 % Ag.
4. Fällung. 0,4280 gr. Subst. gaben 0,2765 gr. Ag = 64,60 % Ag.

Nr. II.

1. u. 2. Fällung. 0,5884 gr. Subst. gaben 0,3340 gr. Ag = 56,76 % Ag.
3. Fällung. 0,4323 gr. Subst. gaben 0,2512 gr. Ag = 58,10 % Ag.
4. Fällung. 0,5007 gr. Subst. gaben 0,3045 gr. Ag = 60,81 % Ag.
5. Fällung. 0,4330 gr. Subst. gaben 0,2740 gr. Ag = 63,28 % Ag.
6. Fällung, 0,3670 gr. Subst. gaben 0,2370 gr. Ag = 64,57 % Ag.
7. Fällung. 0,512 gr. Subst. gaben 0,3311 gr, Ag = 64,66 % Ag.

Aus den oben angeführten Silberbestimmungen ist es ersichtlich, dass wenigstens zwei Säuren in jedem Destillate vorhanden waren und deren Haupttheil immer Essigsäure ausmachte. Ob die Säure, deren Silbersalz crotonsaurem Silber sehr nahe steht, ein Gemisch von der durch Destillation der β-Oxybuttersäure entstandenen Crotonsäure und Essigsäure war, oder ob es sich ums Vorhandensein anderer Säuren, wie Propionsäure, Buttersäure handelte, lässt sich nicht ohne Weiteres entscheiden. Da bei den letzten zwei Gasanalysen Methan mit voller Sicherheit nachgewiesen und in den Gährungsproducten Essigsäure in reichlicher Menge gefunden worden war, glaube ich annehmen zu können, dass β-Oxybuttersäure durch Fäulniss in 2 Moleküle Essigsäure gespalten werde und diese selbst sofort der Fäulniss unterliegen, wobei Methan neben CO_2 stets auftreten.

Die Gleichungen:

I. $(C_4H_7O_3)_2Ca + CaCO_3 + H_2O = 2\,(C_2H_3O_2)_2Ca + CO_2 + 2\,H_2$,

II. $(C_2H_3O_2)_2Ca + H_2O = CaCO_3 + CO_2 + 2\,(CH_4)$

geben ein Bild dieses Gährungsvorganges[1]).

Die Quantität der aus den rückständigen Flüssigkeiten dargestellten Zinksalze fiel so gering aus, dass genaue Bestimmungen mit ihnen nicht ausgeführt werden konnten.

III. Die Zersetzung der β-Oxybuttersäure im thierischen Organismus.

Gerhardt[2]) fand zuerst, dass der Harn von einem Diabetiker sich mit Eisenchlorid braunroth färbte und suchte diese Färbung der Anwesenheit des Acetessigäther zuzuschreiben. Nachdem Deichmüller und Tollens[3]) nachgewiesen hatten, dass die betreffende Substanz nicht Acetessigester, sondern Acetessigsäure sei, gelang es v. Jaksch[4]), diese Säure aus dem Harne darzustellen und deren Kupfersalz zu analysiren.

---

[1]) Vergl. Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XI, S. 561.

[2]) Wiener med. Presse, 28, 1865.

[3]) Annal. d. Chem. u. Pharmac., Bd. 209, S. 22.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. VII, S. 487.

Aus einem Versuche von Minkowski[1]) ergibt sich mit Wahrscheinlichkeit, dass Acetessigsäure durch Oxydation der β-Oxybuttersäure entsteht. Er destillirte eine ziemlich verdünnte wässerige Lösung der aus dem Harne gewonnenen β-Oxybuttersäure unter Zusatz von Kaliumdichromat und Schwefelsäure und fand im Destillate reichliche Mengen Aceton. In einer kurz darauf erschienenen Arbeit «über die Wirkung und die Verwandlung einiger Stoffe im Organismus in Beziehung zur Pathogenese der Acetonämie und des Diabetes» sagt Albertoni[2]): «Ich stellte einige Ver-«suche an, um zu sehen, ob die β-Oxybuttersäure im Organis-«mus Acetessigsäure liefere und auf denselben irgend einen «speciellen Einfluss ausübe. Ich stellte die β-Oxybuttersäure «nach der Methode von Wislicenus dar und brachte sie «Thieren bei, doch fand ich im Harne derselben keine Acet-«essigsäure und beobachtete keine besonderen Wirkungen.»

Nach einer Angabe von Wolpe[3]) scheint kein Parallelismus zwischen Acetonurie und β-Oxybuttersäureausscheidung vorhanden zu sein, im Gegentheil besteht in einzelnen Fällen ein gewisser Antagonismus zwischen der Menge des Acetons und derjenigen der β-Oxybuttersäure: mit dem Steigen der β-Oxybuttersäuremenge nahm der Acetongehalt ab. Dieser Befund lässt sich wohl mit der Annahme von Minkowski, dass die β-Oxybuttersäure die Vorstufe des Acetons sei, vereinigen.

Wenn bei der Oxydation der β-Oxybuttersäure im Organismus Acetessigsäure resp. Aceton als Zwischenstufe entstehen und sofort weiter zersetzt werden, so dürften wir wohl erwarten, dieselben im Harn von einem Thiere, welches nach Eingabe der β-Oxybuttersäure mit CO vergiftet ist, nachzuweisen. Um dieses Verhalten genau zu studiren, habe ich folgende Versuche an Kaninchen, Hunden und Fröschen angestellt.

Die β-Oxybuttersäure wurde als Natronsalz den Thieren beigebracht.

---

[1]) Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmacol., Bd. XVIII, S. 42.
[2]) Ebendas., Bd. XVIII, S. 238.
[3]) Ebendas., Bd. XXI, S. 153.

I. Versuch an Kaninchen..

1. Versuch. 21. Januar 1893. Nachdem ein Kaninchen um 10 Uhr Vorm. 2,588 gr. β-oxybuttersaures Natron unter die Haut injicirt erhielt, wurde es mit CO vergiftet. 3 Uhr Nachm. 1,7425 gr. β-oxybuttersaures Natron subcutan eingespritzt. Die Vergiftung dauerte 9 Stunden.

Da der um 3 Uhr 30 Min. Nachm. entleerte Urin deutliche Eisenchloridreaction zeigte, wurde er mit Wasser verdünnt und destillirt. Das Destillat gab mit Jodjodkalium und Natronlauge reichlichen Niederschlag von Jodoform. Mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge zeigte dasselbe sehr schwach röthliche Färbung.

Der Rückstand wurde mit den übrigen, während der Vergiftung entleerten Urinportionen vereinigt und zur Darstellung der β-Oxybuttersäure verwendet.

Die Calciumverbindung der nach der bekannten Methode dargestellten Säure betrug 5,027 gr. Diese Verbindung kann nicht wohl reines β-oxybuttersaures Calcium, sondern nur ein Gemisch von milchsaurem und β-oxybuttersaurem Calcium sein, da es keinem Zweifel unterliegt, dass beim stark mit CO vergifteten Kaninchen Milchsäure stets im Harne gefunden wird[1]).

Bei mehreren Versuchen, eine möglichst vollständige Trennung der β-Oxybuttersäure von der Milchsäure zu erzielen, zeigt sich, dass ziemlich erhebliche Verluste der ersteren in keinem Falle ausgeschlossen werden konnten. Ich verfuhr desshalb vorläufig auf folgende Weise:

Das Calciumsalz wurde in möglichst wenig Wasser aufgelöst und mit concentrirter Silbernitratlösung versetzt[2]). Nach einigen Stunden wurden die ausgeschiedenen Krystalle von

[1]) Vergl. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XV, S. 351.

[2]) Aus einer 15procentigen, wässerigen Lösung des β-oxybuttersauren Natron wird die Silberverbindung der Säure durch Zusatz von concentrirter Silbernitratlösung gefällt; aber bei gleichzeitiger Anwesenheit von einem milchsauren Salze geschieht diese Fällung nur langsam und unvollkommen. Ich behalte mir spätere Mittheilung über zweckmässige Trennung der β-Oxybuttersäure von der Milchsäure vor.

β-oxybuttersaurem Silber auf dem Filter gesammelt, stark abgepresst und über H_2SO_4 getrocknet.

0,3013 gr. über H_2SO_4 getrockneter Substanz ergaben nach dem Glühen 0,1542 gr. Ag = $(C_4H_7O_3)$ Ag.

Gefunden:	Berechnet:
51,17 %	51.18 %.

Die von β-oxybuttersaurem Silber abfiltrirte Flüssigkeit wurde mit Schwefelwasserstoff behandelt und filtrirt. Nachdem das Filtrat von H_2S durch gelindes Erwärmen befreit war, wurde es mit Barytwasser neutralisirt, mit CO_2 gesättigt, einige Minuten auf dem Wasserbade erhitzt und heiss filtrirt. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade eingedampft und mehrmals mit absolutem Alkohol extrahirt, der Alkoholauszugsrückstand nach dem Verdunsten des Alkohols in Wasser aufgenommen und unter gelindem Kochen durch vorsichtigen Zusatz von concentrirter Zinksulfatlösung in Zinksalz umgewandelt. Das Zinksalz betrug 0,393 gr. Wie die folgende Zinkbestimmung zeigt, ist dieses Zinksalz noch durch Beimenge des β-oxybuttersauren Zink verunreinigt, trotzdem die Ausbeute sehr gering war.

0,0995 gr. bei 110° getrockneter Substanz ergaben 0,0300 gr. Zinkoxyd (Fällen der Lösung mit Na_2CO_3, Glühen des $ZnCO_3$ in Platintiegel) = 0,0240 gr. Zn.

Gefunden:	Berechnet:
24,12 %	26,74 %.

Um die Milchsäureausscheidung zu bestätigen, vergiftete ich dasselbe Kaninchen 9 Stunden lang mit CO. Aus dem während der Vergiftung aufgefangenen Urine stellte ich 1,6130 gr. milchsaures Zink dar.

2. Versuch. 2. Februar 1893. Um 9 Uhr Vorm. wurden 5,261 gr. β-oxybuttersaures Natron einem Kaninchen unter die Haut injicirt. Der Urin, welcher um 1 Uhr Nachm. aus der Blase ausgedrückt wurde, färbte sich mit Eisenchlorid ziemlich stark braunroth. Das Destillat von diesem Urin gab deutliche Lieben'sche Reaction, während die Legal'sche Probe negativ ausgefallen war. Der Harn war vollkommen frei von β-Oxybuttersäure und Milchsäure.

4. Februar 1893. Um 10 Uhr Vorm. bekam dasselbe Kaninchen 6,236 gr. β-oxybuttersaures Natron unter die Haut eingespritzt; es wurde sofort mit CO vergiftet. Die Vergiftung dauerte 8 Stunden. Ein Theil von dem während der Vergiftung gesammelten Urine wurde unter Zusatz von Wasser destillirt. Das Destillat zeigte keine erkennbare rothbraune Färbung bei Zusatz von Nitroprussidnatrium und Natronlauge, wohl aber sehr charakteristische Lieben'sche Reaction mit Jodjodkalium und Natronlauge.

Aus demselben Urine wurden 3,323 gr. Calciumsalz, dessen Haupttheil milchsaures Calcium ausmachte, dargestellt.

0,5773 gr. bei 110° C. getrockneter Substanz lieferten nach dem Glühen im Platintiegel: 0,1460 gr. Ca O = 0,1043 gr. Ca.

Gefunden:	Berechnet:
18,06 %	18,32 %.
	$(C_3H_5O_3)_2Ca$.

Trotzdem der Calciumgehalt der betreffenden Verbindung beinahe mit demjenigen des milchsauren Calcium übereinstimmte, gab die concentrirte Lösung von demselben Calciumsalz bei Zusatz von concentrirter Silbernitratlösung einen weissen Niederschlag, der wohl der Anwesenheit der β-Oxybuttersäure zuzuschreiben ist. Um eine Analyse auszuführen, war die Menge des gewonnenen Silbersalzes zu gering.

3. Versuch. 9. Februar 1893. Einem Kaninchen wurden 5,6991 gr. β-oxybuttersaures Natron unter die Haut eingespritzt (10 Uhr Vorm.). Der um 3 Uhr Nachm. entleerte Urin zeigte sehr schöne Eisenchloridreaction. Das Destillat von dem Urine gab keine deutliche Rothfärbung mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge; sobald dasselbe mit Jodkalium und Natronlauge versetzt war, entstand krystallinischer gelber Niederschlag von Jodoform.

13. Februar 1893. Um 9 Uhr Vorm. wurden 6,995 gr. β-oxybuttersaures Natron demselben Kaninchen subcutan injicirt. Nach der Injection wurde das Thier mit CO vergiftet. Die Vergiftung dauerte 7 Stunden. Im Destillat von dem während der Vergiftung entleerten Urine wurde Aceton durch Lieben'sche Reaction nachgewiesen. Das aus dem ätherischen

Extracte von dem Urine gewonnene Calciumsalz betrug 4,8862 gr.

4. Versuch. 14. Februar 1893. Einem kleinen Kaninchen wurden um 10 Uhr Vorm. 1,647 gr. β-oxybuttersaures Natron unter die Haut injicirt und gleich mit CO behandelt. Die Vergiftung dauerte 4 Stunden. Das Destillat von dem Urine zeigte nur schwache Lieben'sche Reaction. Aus dem ätherischen Extracte von Harne wurden 0,4583 gr. Calciumsalz dargestellt.

II. Versuch am Hunde.

5. Versuch. 2. Februar 1893. 10 Uhr Vorm. wurden 5,329 gr. β-oxybuttersaures Natron unter die Haut injicirt. Nach der Injection wurde das Thier mit CO 8 Stunden lang vergiftet. Das Destillat von dem Urine gab sehr schwache Legal'sche Reaction, jedoch reichlichen Niederschlag mit Jodjodkalium und Natronlauge. Aus dem ätherischen Extracte vom Harne wurden 3,4683 gr. Calciumsalz dargestellt.

18. Februar 1893. Demselben Hunde wurden 4,5210 gr. β-oxybuttersaures Natron unter die Haut eingespritzt. Der nach der Injection entleerte Urin enthielt keine Spur von Aceton und von Acetessigsäure.

III. Versuche an Fröschen.

6. Versuch. 4. März. 1893. 4,261 gr. β-oxybuttersaures Natron in 10 cbcm. Wasser aufgelöst und 3 grossen Fröschen subcutan eingespritzt (um 3 Uhr Nachm.).

Um 9 Uhr Morgens gaben sie 25 cbcm. Urin, der sich mit Eisenchlorid intensiv roth färbte. Im Destillate von diesem Urine wurde Aceton durch Lieben'sche Reaction nachgewiesen.

7. Versuch. 6. März 1893. 5,273 gr. β-oxybuttersaures Natron in 13 cbcm. Wasser aufgelöst und 4 grossen Fröschen in Lymphsack injicirt (um 9 Uhr Vorm.).

Der um 5 Uhr Nachm. entleerte Urin zeigte schon schöne rothe Färbung mit Eisenchlorid. Das Destillat von dem Urin

gab mit Natronlauge und Jodjodkalium reichlichen Niederschlag von Jodoform.

Wie Huppert[1]) in seinem Handbuch, «Analyse des Harn», angibt, ist die Lieben'sche Probe die empfindlichste, da Lösungen, welche mehr als 0,01 mgr. Aceton in einer Probe enthalten, sogleich mit Jodjodkalium und Alkalihydrat einen Niederschlag geben. Da ferner 0,8 mgr. Aceton die geringste Menge ist, bei welcher die Probe von Legal noch eintritt, und das Auftreten des Alkohols im Harne nach der Injection der β-Oxybuttersäure nicht denkbar ist, so lässt sich nicht verkennen, dass in oben angeführten Versuchen Aceton resp. Acetessigsäure im Harne vorhanden war. Es ist daher mit Bestimmtheit erwiesen, dass bei der Oxydation der β-Oxybuttersäure im Organismus Acetessigsäure als Zwischenstufe eintritt, was mit der Annahme von Minkowski übereinstimmt[2]).

---

[1]) Analyse des Harn, 1890, S. 33—34.

[2]) Als diese Arbeit bereits im Drucke war, erschien eine Abhandlung von Minkowski (Archiv f. experiment. Pathol. und Pharmacol., Bd. XXXI, S. 183, 1893): «Untersuchung über den Diabetes mellitus nach Exstirpation des Pankreas». Dort wird angegeben, dass der Harn von einem durch Exstirpation des Pankreas diabetisch gemachten Hunde nach Eingabe von optisch activem β-oxybuttersauren Natron eine starke Eisenchloridreaction und im Destillate mit Jodjodkalium und Kalilauge einen reichlichen Niederschlag von Jodoform gab. Mit dieser Angabe stimmen meine oben angeführten Beobachtungen überein und beweisen zugleich, dass ein künstlicher oder natürlicher Diabetes für dieses Verhalten nicht erforderlich ist.

Zur Frage über die Wirkungsart der Eisenmittel.

Von

Carl Th. Mörner in Upsala.

(Der Redaction zugegangen am 27. Februar 1893.)

Während das Vermögen der Eisensalze, die Blutbildung zu erhöhen, — insbesondere bei Chlorose, — seit Langem bekannt ist, kaum von Jemandem bestritten wird, und wohl als ein unumstössliches Factum angesehen werden kann, sind die Ansichten über die Art, wie die Eisenpräparate diese Wirkung hervorbringen, ziemlich getheilt.

Wenn man einerseits den Eisengehalt des rothen Blutfarbstoffes, andererseits die zunehmende Vermehrung der Menge des Farbstoffes bei fortgesetztem Gebrauch von Eisenpräparaten in Betracht zieht, ist man ohne Weiteres zu der Annahme geneigt, dass das Eisensalz nach einer mehr oder weniger vollständigen Resorption durch Verbindung mit Eiweiss Hämoglobin bilden könnte, denn man hat a priori keinen Grund, daran zu zweifeln, dass die Eisensalze das Vermögen haben, an der Synthese des Hämoglobin theilzunehmen. Wenn diese Auffassung richtig wäre, so müsste vor allen Dingen das per os eingeführte Eisensalz wirklich in erwähnenswerthem Maasse zur Resorption kommen. Könnte man beweisen, dass dies der Fall ist, so hätte man dadurch eine Stütze für die obenerwähnte Auffassung erhalten, obgleich dann noch übrig bliebe, die Möglichkeit einer Hämoglobinsynthese mit Eisen in Salzform zu beweisen; ergäbe dagegen eine Untersuchung der Resorption ein negatives Resultat, so würde damit die ursprüngliche Theorie über die Wirkungsart des Eisens unhaltbar.

Das Letztere ist eingetroffen. Zahlreiche hierauf bezügliche Untersuchungen haben bewiesen, dass die Eisensalze, welcher Art sie auch sein mögen, nach Einführung in den Verdauungskanal im Allgemeinen nicht resorbirt werden; in den Fällen, wo die Möglichkeit einer Resorption nicht vollständig ausgeschlossen erschien, geschah es nur in verschwindend geringen Quantitäten, welche in keinem Verhältniss zu der grossen Menge des eingenommenen Eisenpräparates standen.

Es war also nothwendig, sich nach einem anderen Erklärungsgrund für die Wirkung der Eisenmittel umzusehen, und einen solchen gab Bunge 1884 in seiner interessanten Abhandlung: «Ueber die Assimilation des Eisens»[1]). Mehrere früher bekannte Thatsachen lassen sich durch Bunge's Theorie erklären, und meines Wissens ist bis jetzt nichts zu Tage gefördert worden, was derselben widerspricht.

Weil unsere gewöhnlichen Nahrungsmittel Eisen enthalten, nicht unter der Form einfacher Salze, sondern in Gestalt von sehr complicirten, organischen Verbindungen (eisenhaltige Nucleoalbuminen etc.), welche Bunge besonders studirt hat, so hält Bunge diese organischen Eisenverbindungen für resorbirbar und glaubt, dass sie das unentbehrliche Material für die normale Hämoglobinbildung ausmachen; andere Eisenverbindungen (Salze) sind dazu untauglich[2]).

Und ganz unbestreitbar ist es ja, dass z. B. der Vogelembryo oder das junge Säugethier, welche auf ein einziges,

---

[1]) Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. 9, S. 49.

[2]) Zu diesen für die Hämoglobinbildung werthvollen organischen Eisenverbindungen wäre indessen das Hämoglobin selbst nicht zu rechnen, wie man leicht genug annehmen möchte. Mit der Fleischnahrung werden ja recht grosse Mengen Hämoglobin eingeführt, aber der eisenhaltige Complex desselben würde bald durch den Verdauungsprocess in Gestalt einer unresorbirbaren Verbindung, dem Hämatin, ausgeschieden, das man desshalb in unverminderter Menge in den Excrementen wiederfinden sollte.

Die ursprüngliche Synthese des eisenhaltigen Complexes verlegt Bunge ausschliesslich in das Pflanzenreich, so dass der Organismus seinen Bedarf an diesem Material direct oder indirect aus vegetabilischen Nahrungsmitteln zieht.

bestimmtes Nahrungsmittel angewiesen sind, — Eidotter bez. Milch, — die kein Eisen in Form einfacher Salze enthalten, im Stande sind, aus den organischen Eisenverbindungen dieser Nahrungsmittel Hämoglobin zu bilden.

Wenn die organischen Eisenverbindungen aus irgend einer Ursache so gründlich zersetzt werden, dass das Eisen in einer einfachen Form (wie Salz, Oxyd oder Schwefelverbindung) ausgeschieden wird, so haben sie auch damit ihren Werth als hämoglobinbildende Substanz verloren, und nach Bunge's Erfahrungen über die organische Eisenverbindung des Eidotters, das Hämatogen, liegt die Möglichkeit einer solchen Zersetzung im Darmkanal nicht fern, da das Hämatogen recht geringe Widerstandskraft gegen Reagentien zeigt, und besonders für die Einwirkung von Schwefelwasserstoff empfindlich ist.

Indem Bunge diesen Umstand mit der klinischen Erfahrung kombinirt, dass die Chlorose oft von Störungen im Verdauungsapparat und von daselbst auftretenden abnorm gesteigerten Zersetzungsprocessen begleitet wird, will er die Hauptursache der Chlorose in einer erhöhten Zersetzung des mit der Nahrung eingeführten «organischen Eisens» sehen; zugleich nimmt er an, dass die günstige Wirkung der Eisensalze bei Chlorose darin besteht, dass sie auf die eine oder die andere Weise «das organische Eisen» bei seinem Durchgang durch den Darmkanal vor Zersetzung schützen, so dass dieses zur Resorption gelangt und an der Neubildung von Hämoglobin theilnehmen kann.

Was die Art der bei den Eisenpräparaten angenommenen schützenden Wirkung betrifft, so behauptet Bunge, dass dieselbe hauptsächlich in dem Vermögen der Eisensalze den Schwefel zu binden besteht, der in Form von Schwefelwasserstoff vorkommt und der Existenz des organischen Eisens feindlich ist.

Aber noch eine andere Wirkungsart wäre a priori ebenso annehmbar, entweder für sich allein oder als Unterstützung der genannten schwefelbindenden Wirkung. Es liegt die Vermuthung auf der Hand, dass die Eisensalze, wenn sie in so

grosser Menge, wie bei Chlorose üblich ist, eingeführt werden, eine antiseptische, Bakterien-tödtende Wirkung ausüben könnten, dadurch den Fäulnissprocess im Darmkanal vermindernd eine allzuschnelle Zersetzung hindern, und auf diese Weise einen Schutz für die empfindlichen organischen Eisenverbindungen bilden könnten.

Die Möglichkeit hierzu hat Bunge flüchtig angedeutet, indem er die ganz besonders kräftige Wirkung der Eisenmittel bei Chlorose betont, bei welcher Krankheit man annehmen kann, dass die Salzsäure — «das normale Antisepticum» — infolge von complicirenden katarrhalischen Zuständen der Magenschleimhaut, wie es scheint, in subnormaler Menge auftritt.

Wenn man sich also in der Hauptsache auf Bunge's Annahmen stützt, hat man zunächst zwei Wirkungsarten der Eisensalze im Darm in Betracht zu ziehen, jede für sich oder beide einander unterstützend.

Entweder üben sie eine allgemein antiseptische Wirkung aus, indem sie einen allzuweitgehenden bakteritischen Zersetzungsprocess auf die Norm zurückzuführen vermögen, dadurch die Gefahr einer direct durch die Bakterien hervorgebrachten Zersetzung der organischen Eisenverbindungen vermindernd, wie sie auch einer hypernormalen Bildung von Schwefelwasserstoff, der dem «organischen Eisen» so gefährlich ist, *zuvorkommen;* oder sie vermögen nicht den Zersetzungsprocess als solchen und die damit vorbundene Entstehung von Schwefelwasserstoff einzuschränken (üben keine antiseptische Wirkung aus), wohl aber können sie unmittelbar, je nachdem bei der Fäulniss Schwefelwasserstoff entsteht, mit demselben unschädlichen Schwefeleisen bilden.

Die Frage kann also in diese Form zusammengefasst werden: üben die Eisensalze einen hemmenden Einfluss auf den Fäulnissprocess im Darm aus, sind sie, mit anderen Worten, in diesem Fall als Antiseptica zu betrachten — oder ist dies nicht der Fall? Da diese Frage in Bunge's Untersuchung unbeantwortet gelassen ist, und dieselbe, so viel ich weiss, auch von anderer Seite nicht erörtert worden ist, habe ich es versucht, durch directe Experimente zu ihrer Lösung beizutragen.

Wie bekannt, besitzt man in dem Verhältniss zwischen dem Aetherschwefelsäure- und dem Sulfatschwefelsäuregehalt des Urins ein Maass für die Intensität des Fäulnissprocesses im Darm, dessen man sich bedienen kann, um diesbezügliche Veränderungen festzustellen. Eine Steigerung der relativen Menge von Aetherschwefelsäure gibt erhöhte Zersetzung an, eine Abnahme der Aetherschwefelsäure ebenso verminderte Zersetzung im Darm. Hat man sich also mit der normalen Aetherschwefelsäureausscheidung eines Menschen bekannt gemacht, und lässt ihn ein Mittel einnehmen, das im Darme factisch antiseptische Wirkung ausübt, so hat man eine Abnahme der Aetherschwefelsäure zu erwarten, sowie zum Beispiel Baumann bei Versuchen mit Kalomel, Morax bei solchen mit Jodoform fand.

Umgekehrt ist man berechtigt, anzunehmen, dass ein Mittel antiseptisch im Darme wirkt, wenn durch das Einnehmen desselben eine constante Abnahme der Aetherschwefelsäure herbeigeführt wird.

Auf diese Voraussetzung gründet sich die vorliegende Untersuchung, die in 5 Zeitperioden zerfällt, von denen jede, mit Ausnahme von No. IV, 8 Tage umfasst.

Während dieser Perioden wurde für jeden Tag, von 8 Uhr Nachmittags des einen Tages bis zur selben Zeit des folgenden gerechnet, die ganze von mir gelassene Urinmenge gesammelt, und, nachdem die ganze Tagesportion gemessen[1]) und die Totalschwefelsäure und Aetherschwefelsäure[2]) in besonderen Portionen bestimmt worden war, die Menge Sulfat-(S)- und Aether-(e)schwefelsäure pro Tag, sowie das Verhältniss zwischen Beiden ausgerechnet.

---

[1]) Unter der abgekürzten Bezeichnung, Aetherschwefelsäure, wird hier alle Schwefelsäure verstanden, die in den verschiedenen Arten Aetherschwefelsäure des Urins enthalten ist. (Es sollte eigentlich heissen: die in den Aetherschwefelsäuren enthaltene Schwefelsäure).

[2]) Während der zweiten Hälfte von Ser. II und während Ser. III—V wurde der Harn von zwei aufeinanderfolgenden Tagen vermischt, so dass die in der Tabelle angegebene Grösse der Tagesportion in diesen Fällen durch das Halbiren zweier Tagesportionen erhalten wurde.

Während der Versuchszeit wurde, so weit dies möglich war, eine regelmässige Lebensweise eingehalten, und namentlich die Aufmerksamkeit darauf gerichtet, dass nicht durch Speise oder Trank Sulfate eingeführt wurden (z. B. durch Mineralwasser).

Die Versuchsreihe wurde mit einer Periode von 8 Tagen (Ser. I) eröffnet, um das Verhältniss e : S unter normalen Verhältnissen festzustellen. Während Ser. II nahm ich täglich 1 Gr. krystall. Eisenchlorür in Form von Pillen à 0,15 Gr. (nach dem Frühstüch 2 St., Mittags 3 St., zum Abendessen 2 St.), eine Eisenmenge, welche den grössten in der Praxis gebräuchlichen Dosen entspricht. Während Ser. III wurden die täglichen Dosen auf 3 Gr. Eisenchlorür erhöht (6 St. + 8 St. + 6 St. Pillen), wodurch die eingenommene Eisenmasse um Vieles grösser war, als je bei der medicinischen Verwendung des Eisens in Frage kommen. Nach einer Pause von 8 Tagen, in deren letzter Hälfte (Ser. IV) der Urin untersucht wurde, um mit Ser. I verglichen zu werden, fing ich wieder an, Eisensalz einzunehmen, nun Ferrolactat, 3 Gr. täglich, womit während 8 Tagen (Ser. V) fortgesetzt wurde. Ueber die erhaltenen Resultate gibt die Tabelle nähere Auskunft. Man braucht nur einen flüchtigen Blick auf den Mittelwerth in der letzten Spalte, welche das Verhältniss e : S angibt, zu werfen, um zur Einsicht zu kommen, dass dieser Werth annähernd constant bleibt beim Vergleichen sowohl der verschiedenen Eisenperioden unter einander und der beiden Nicht-Eisenperioden unter einander, sowie auch der Eisenperioden (Mittelwerth = 1 : 10,4) und Nicht-Eisenperioden (Mittelwerth = 1 : 10,9) gegen einander. Es geht hervor, dass das Einnehmen von Eisensalz, selbst in so excessiven Dosen wie die eben angeführten, keinen Einfluss auf das Verhältniss zwischen Aether- und Sulfatschwefelsäure ausgeübt, besonders nicht die Aether-

[1]) Alle diese Bestimmungen wurden in Uebereinstimmung mit Salkowski's Vorschrift ausgeführt; für die Bestimmung von S wurden 100 Cbcm. Urin, für die Bestimmung von e 200 Cbcm. in Arbeit genommen. Von dem mit Barytlösung behandelten Filtrat wurden für die Bestimmung von e 200 Cbcm. zersetzt, 100 Cbcm. des ursprünglichen Urins entsprechend.

schwefelsäure vermindert hat, wesshalb angenommen werden kann, dass keine antiseptische Wirkung der Eisensalze im Darmkanal stattgefunden hat.

Die oben aufgestellte Frage: üben die Eisensalze einen hemmenden Einfluss auf den Fäulnissprocess im Darm aus? hat also durch diese Untersuchung eine bestimmte verneinende Antwort erhalten, und zugleich ist es klar, dass das Vermögen die organischen Eisenverbindungen der Nahrungsmittel zu schützen, welches nach Bunge den Eisensalzen zuerkannt werden muss, seinen Grund nicht in einer hemmenden Einwirkung auf den Fäulnissprocess im Darm haben kann, weswegen auch der Gedanke, darin ganz oder zum Theil eine Erklärung für die therapeutische Wirkung der Eisenmittel zu sehen, wegfallen muss.

Durch das Wegfallen dieser Möglichkeit gewinnt die andere, früher erwähnte um so mehr Wahrscheinlichkeit, und wir haben noch mehr Veranlassung, in Uebereinstimmung mit Bunge, den schützenden Einfluss der Eisensalze auf die organischen Eisenverbindungen der Nahrungsmittel als eine Folge ihres Vermögens, Schwefelwasserstoff zu binden, anzusehen, und zunächst darin eine Erklärung für den therapeutischen Nutzen der Eisenmittel zu finden.

Datum. 1892.	Urinmenge.	Spec. Gewicht.	Totalschwefelsäure		Sulfatschwefelsäure Gr. pro Tag.	Aetherschwefelsäure		Verhältniss e : S.
			Gr. in 100 cc.	Gr. pro Tag.		Gr. in 100 cc.	Gr. pro Tag.	
	Ser. I.	**Ohne Eisenpräparat.**	**(8 Tage).**					
25./10.—26./10.	2,780	1,0135	0,1347	3,745	3,400	0,0124	0,345	1: 9,9
26./10.—27./10.	2,460	1,0150	0,1646	4,049	3,683	0,0149	0,366	1:10,1
27./10.—28./10.	2,420	1,0170	0,1835	4,441	4,054	0,0160	0,387	1:10,5
29./10.—30./10.	2,300	1,0165	0,1787	4,110	3,786	0,0141	0,324	1:11,7
30./10.—31./10.	2,000	1,0190	0,2176	4,352	4,006	0,0173	0,346	1:11,6
31./10.—1./11.	2,210	1,0165	0,1705	3,768	3,423	0,0156	0,345	1: 9,6
1./11.—2./11.	2,800	1,0145	0,1557	4,368	4,015	0,0126	0,353	1:11,4
2./11.—3./11.	2,670	1,0125	0,1400	3,738	3,418	0,0120	0,320	1:10,7
	Mittelwerth:		—	—	**3,723**	—	**0,348**	**1:10,7**

Datum. 1892.	Urinmenge.	Spec. Gewicht.	Total-Schwefelsäure Gr. in 100 cc.	Total-Schwefelsäure Gr. pro Tag.	Sulfatschwefelsäure Gr. pro Tag.	Aetherschwefelsäure Gr. in 100 cc.	Aetherschwefelsäure Gr. pro Tag.	Verhältniss e : S.
Ser. II. 1 Gr. Eisenchlorür pro Tag. (8 Tage).								
5./11.—6./11.	3,100	1,0120	0,1196	3,708	3,364	0,0111	0,344	1: 9,8
7./11.—8./11.	2,930	1,0135	0,1334	3,909	3,572	0,0115	0,337	1:10,6
8./11.—9./11. 9./11.—10./11.	2,900	1,0135	0,1307	3,790	3,474	0,0109	0,316	1:10,9
10./11.—11./11. 11./11.—12./11.	2,590	1,0160	0,1482	3,933	3,573	0,0139	0,360	1: 9,9
12./11.—13./11. 13./11.—14./11.	2,900	1,0130	0,1200	3,480	3,132	0,0120	0,348	1: 9,0
	Mittelwerth:		—	—	**3,428**	—	**0,341**	**1:10,0**
Ser. III. 3 Gr. Eisenchlorür pro Tag. (8 Tage).								
16./11.—17./11. 17./11.—18./11.	2,660	1,0130	0,1263	3,359	5,051	0,0116	0,308	1: 9,9
18./11.—19./11. 19./11.—20./11.	2,510	1,0160	0,1675	4,204	3,855	0,0139	0,349	1:11,0
20./11.—21./11. 21./11.—22./11.	2,580	1,0155	0,1562	4,030	3,705	0,0126	0,325	1:11,4
22./11.—23./11. 23./11.—24./11.	2,420	1,0165	0,1524	3,688	3,361	0,0135	0,327	1:10,3
	Mittelwerth:		—	—	**3,498**	—	**0,322**	**1:10,8**
Ser. IV. Ohne Eisenpräparat. (4 Tage).								
28./11.—29./11. 29./11.—30./11.	2,800	1,0150	0,1638	4,586	4,227	0,0128	0,359	1:11,8
30./11.—1./12. 1./12.—2./12.	2,340	1,0190	0,1693	3,967	3,623	0,0147	0,344	1:10,5
	Mittelwerth:		—	—	**3,925**	—	**0,351**	**1:11,1**
Ser. V. 3 Gr. Ferrolactat pro Tag. (8 Tage).								
2./12.—3./12. 3./12.—4./12.	2,000	1,0200	0,2105	4,210	3,874	0,0168	0,336	1:11,5
4./12.—5./12. 5./12.—6./12.	2,250	1,0185	0,1680	3,780	3,472	0,0137	0,308	1.11,2
6./12.—7./12. 7./12.—8./12.	2,240	1,0170	0,1574	3,526	3,197	0,0147	0,329	1: 9,4
8./12.—9./12. 9./12.—10./12.	2,310	1,0165	0,1566	3,617	3,278	0,0147	0,339	1: 9.7
	Mittelwerth:		—	—	**3,455**	—	**0,328**	**1:10,5**

Beitrag zur Kenntniss des Leucins.

Von

Dr. Bernhard Gmelin.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institute zu Tübingen.)

Auszug aus einer der naturwissenschaftlichen Facultät zu Tübingen am 23. November 1892 vorgelegten Inauguraldissertation.
(Der Redaction zugegangen am 5. März 1893.)

Seitdem zuerst die französischen Forscher Gerhardt, Laurent[1]) und Cahours[2]) auf Grund genauer Analysen, deren Richtigkeit in Deutschland durch Strecker[3]) bestätigt ward, eine empirische Formel für das Leucin aufgestellt und in ihm ein Homologon des «Glycins» vermuthet hatten, seitdem weiter einige Beobachtungen über gewisse eigenthümliche Zersetzungsweisen, die es erleidet, es wahrscheinlich gemacht, dass das Leucin eine Amidocapronsäure sei, und seitdem es endlich Hüfner[4]) gelungen war, den Körper durch Erhitzen mit rauchender Jodwasserstoffsäure auf 140° sogar direct in Capronsäure und Ammoniak zu zerlegen, hat die Kenntniss der Constitution dieses physiologisch so wichtigen Stoffes lange Zeit eine wesentliche Förderung nicht mehr erfahren.

Wohl musste man sich sagen, dass entsprechend den verschiedenen Amidocapronsäuren, die denkbar sind, es auch verschiedene sogenannte «natürliche» — d. h. vom lebenden Organismus als Bausteine verwandte — Leucine geben könne, und es hatte desshalb auch Hüfner[5]) bereits den Versuch

---

[1]) Compt. rend. XXVII, 256.
[2]) Compt. rend. XXVII, 265.
[3]) A. Ch. Pharm. 72, 89.
[4]) Zeitschr. f. Chem., 1868, S. 391.
[5]) Journ. f. pr. Ch., [2], 1, 6.

unternommen, über die Constitution eines natürlichen Leucins durch Vergleichung von dessen Eigenschaften mit den Eigenschaften zweier Amidocapronsäuren, die er auf synthetischem Wege, die eine aus dem Monobromsubstitutionsprodukte der Gährungscapronsäure, die andere aus Isovaleraldehyd gewonnen, einigen Aufschluss zu erhalten; allein zu einer endgültigen Entscheidung war die ganze Frage, wie wir jetzt wissen, überhaupt damals noch gar nicht reif. Dazu fehlte vor Allem die Kenntniss derjenigen Art von Isomerie, die sich in dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein der sogenannten optischen Aktivität, sowie im Falle von deren Vorhandensein durch das jeweilige Vorzeichen derselben zu erkennen gibt.

Erst im Jahre 1883 hat Mauthner[1]), angeregt durch Le Bel's und van t'Hoff's Betrachtungen über das asymmetrische Kohlenstoffatom, unter anderen Körpern auch das Leucin auf seine optische Aktivität geprüft und hierbei festgestellt, dass mit Salzsäure aus Casëin gewonnenes Leucin in der That rechtsdrehend ist, wogegen die oben erwähnten synthetisch gewonnenen Präparate beide inaktiv sind.

Seitdem ist aber unsere Kenntniss des Leucins durch die sorgfältigen, mehrere Jahre hindurch fortgesetzten, Untersuchungen E. Schulze's[2]) und seiner Schüler sehr wesentlich erweitert worden. Diese Forscher zeigten nämlich, dass das optisch inaktive Leucin, das man durch Kochen von pflanzlichem Eiweiss mit Barytwasser erhält, in der That α-Amidoisobutylessigsäure ist, und desshalb genau mit jener ebenfalls optisch inaktiven α-Amidoisobutylessigsäure übereinstimmt, die man aus dem Isovaleraldehyd nach dem bekannten synthetischen Verfahren gewinnt.

Schulze und Likiernik bewiesen die Identität der beiden in dreifacher Weise:

1. indem sie die Löslichkeit der Amidosäuren selber verglichen und gleich fanden;

---

[1]) Diese Zeitschr., Bd. 7, S. 223.

[2]) Diese Zeitschr., Bd. 9, S. 63, 1885; B. B. XXIV, S. 669, 1891.

2. indem sie mit Hülfe einer Aussaat von Penicillium glaucum aus beiden Präparaten ihre optisch aktiven und zwar nach links drehenden Isomeren darstellten, die Stärke von deren Aktivität massen und die letztere abermals bei beiden gleich gross fanden; und indem sie
3. aus beiden die entsprechenden Oxysäuren bereiteten und beim Vergleiche von deren Eigenschaften auch die Identität dieser Derivate feststellten.

Wie man sieht, bedienten sich die verschiedenen Forscher zur Feststellung der Isomerieverhältnisse des Leucins zunächst der Synthese und alsdann des Vergleichs einer oder mehrerer, verschiedener, auf solche Weise gewonnener Präparate mit einem durch Zersetzung von Eiweiss erhaltenen, sogenannten natürlichen Leucin.

Auf den Rath des Herrn Professor Hüfner habe ich es unternommen, die Frage nach der Constitution einiger natürlicher Leucine durch successiven Abbau derselben bis zu den ihnen zu Grunde liegenden Capronsäuren direct zu lösen.

Von den gewählten Leucinen waren zwei thierischen, das dritte pflanzlichen Ursprungs. Das letztere verschaffte ich mir durch Extraction von Hefe; die beiden ersten, das eine aus Caseïn, das andere aus dem Eiweiss des Hämoglobins, und zwar durch Kochen dieser Körper mit Salzsäure und Zinnchlorür nach der von Hlasiwetz und Habermann[1]) eingeschlagenen, von Drechsel und Siegfried[2]) modificierten Methode.

Aus der Hefe stellte ich mir das Material folgendermassen dar:

Das wässrige Extract von frischer Presshefe wurde durch Eintropfenlassen in absoluten Alkohol von dem invertierenden Ferment der Hefe befreit. In dem Filtrat, das nach dem Abdestillieren des Alkohols in Folge von Anwesen-

---

[1]) Annal. d. Chem. u. Pharm., 169, 1873.

[2]) B. B. XXIV, 1891, 3.

heit freier Phosphorsäure sauer reagirte, entfernte ich zuerst mittelst Phosphorwolframsäure, die nach dem Drechsel-schen[1]) Verfahren bereitet war, die Basen, um sodann das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag auf Leucin zu verarbeiten. Das hieraus erhaltene Roh-Leucin konnte durch mehrfaches Umkrystallisiren aus Ammoniak haltendem, 90procentigem Alkohol, sowie durch öfteres Ueberführen in das Kupfersalz vollständig gereinigt werden, ohne die von Schulze[2]) angegebene Methode der fraktionierten Fällung der Kupfersalze befolgen zu müssen. Die Ausbeute betrug im besten Falle nur 0,17 % der angewandten Menge Hefe.

Auch aus Caseïn und Hämoglobineiweiss — letzteres war aus krystallisiertem Hämoglobin gewonnen und der Rückstand der Häminbereitung nach Nencki — wurde zuerst ein Präparat von Roh-Leucin erhalten, das sich sodann durch öfteres Ueberführen in das Kupfersalz, sowie durch mehrfaches Umkrystallisieren vollständig reinigen liess. Die Ausbeute an reiner Substanz betrug 2½—3 % des Ausgangsmaterials.

Alle 3 Präparate[3]) bildeten völlig weisse, atlasglänzende, fettig anzufühlende, von Wasser sehr schwer benetzbare, ausserordentlich leichte Blättchen. Langsam erhitzt sublimierten sie, ohne zu schmelzen und ohne Rückstand, während beim raschen Erhitzen Bräunung und Geruch nach Amylamin eintrat.

$Hg(NO_3)_2$, das Schulze[4]) als Fällungsmittel für die Phenylamidopropionsäure angibt, gab mit den Lösungen der Leucine selbst nach tagelangem Stehen keine Fällung.

Beim Kochen derselben mit alkalischer Bleioxydhydrat-Lösung, eine Reaktion, die Gorup-Besanez[5]) zur Entschwefelung von Leucin vorschlägt, bildete sich kein Schwefelblei, ein Beweis, dass die Leucine schwefelfrei waren.

---

[1]) Vergl. Drechsel, B. B. XX, 1887, 2, 1452.

[2]) Diese Zeitschr., Bd. 9, S. 63, 1885.

[3]) Der Kürze halber will ich das aus Hefe erhaltene Leucin mit Hf-Leucin, das aus Caseïn erhaltene mit C-Leucin, das aus Hämoglobineiweiss erhaltene mit Hb-Leucin bezeichnen.

[4]) Diese Zeitschr., Bd. 9, S. 63, 1885.

[5]) Annal. d. Chem. u. Pharm., 118, S. 230.

Die Elementaranalysen, die Analysen der in Wasser nahezu unlöslichen Kupfersalze, sowie der Chlorhydrate gaben folgende Werthe:

Hf-Leucin:

1. 0,1512 gr. Subst. gaben 0,3044 gr. CO_2 und 0,1376 gr. H_2O.
2. 0,2671 gr. » » 25,7 cbcm. N bei 719 mm. b und 8,5° C.
3. 0,2460 gr. Kupfersalz gaben 0,0614 gr. Cu_2S.
4. 0,4011 gr. Chlorhydrat gaben 0,3434 gr. AgCl.

C-Leucin:

5. 0,1244 gr. Subst. gaben 0,2501 gr. CO_2 und 0,1139 gr. H_2O.
6. 0,1295 gr. » » 0,2604 gr. CO_2 und 0,1146 gr. H_2O.
7. 0,2283 gr. » » 21,3 cbcm. N. bei 725 mm. b und 14° C.
8. 0,3590 gr. Kupfersalz gaben 0,0875 gr. Cu_2S.
9. 0,4793 gr. Chlorhydrat gaben 0,4068 gr. AgCl.

Hb-Leucin:

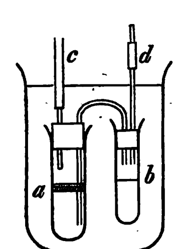
10. 0,1446 gr. Subst. gaben 0,2906 gr. CO_2 und 0,1337 gr. H_2O.
11. 0,4211 gr. » » 40,8 cbcm. N bei 726,4 mm. b und 10,5° C.
12. 0,3273 gr. Kupfersalz gaben 0,0800 gr. Cu_2S.
13. 0,4452 gr. Chlorhydrat gaben 0,3769 gr. AgCl.

Hf-L.	C-L.	Hb-L.	Berechnet.
C = 54,90%	54,84%	54,80%	54,96% auf $C_6H_{13}NO_2$
H = 10,11	9,83	10,27	9,92
N = 10,95	10,46	11,05	10,69
O = 24,04	24,87	23,88	24,43
Cu = 19,93	19,47	19,54	19,62 auf $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$
Cl = 21,17	20,99	20,93	21,19 » $C_6H_{13}NO_2 . HCl$

Die Löslichkeitsverhältnisse wurden beim C-Leucin in Beziehung auf Wasser und Alkohol, bei den beiden anderen nur in Beziehung auf Wasser untersucht, da sich die Löslichkeit in Alkohol als zu gering erwies, um genau festgestellt werden zu können.

Die Bestimmung in der Kälte geschah nach der üblichen Methode. Zur Bestimmung der Löslickeit in siedendem Wasser musste ich mich des im Folgenden näher beschriebenen Apparates bedienen, da sich das Leucin selbst bei Benützung des Heisswassertrichters aus der heissen Lösung zu rasch wieder ausschied.

In dem weiteren Reagensglas a befindet sich die heissgesättigte Lösung von Leucin, das ausgeschieden eine auf der Lösung schwimmende Schicht bildet. b ist ein gewogenes Wägeglas. a ist mit b durch ein Uebersteigrohr verbunden und kann durch Quetschen des Kautschukrohrs c geschlossen werden, während der Glasstöpsel d aus dem Kautschukröhrchen über b erst weggenommen wird, wenn bei c gequetscht wird, um Ueberdestillieren von Wasser zu verhüten. Hat man die Lösung in a durch Erhitzen des Salzbades, in das der ganze Apparat eingetaucht ist, 5 Min. zum Sieden gebracht, so schliesst man, nachdem man den Glasstöpsel d abgenommen, den Kautschukschlauch c, und es wird nun von der klaren, am Boden von a befindlichen Lösung nach Bedarf nach b hinübergedrückt. Sodann wird b herausgenommen, rasch mit dem eingeschliffenen Stöpsel verschlossen, von der Salzlösung gereinigt, erkalten gelassen und gewogen. Im Uebrigen geschieht die Bestimmung in gewöhnlicher Weise.



Die heisse alkoholische Lösung musste dagegen durch einen Heisswassertrichter filtriert werden, da hier das Leucin nicht obenauf schwamm.

a) Hf-Leucin.

1. 7,5976 gr. Lösung enthielten 0,2550 gr. Leucin bei 19° C.
2. 5,5158 » » » 0,3260 » » bei Siedetemperatur der gesättigten Lösung.

b) C-Leucin.

1. 8,4309 gr. Lösung enthielten 0,2848 gr. Leucin bei 18° C.
2. 17,3131 » » » 0,5632 » » bei 20° C.
3. 2,9260 » » » 0,0975 » » bei 19° C.
4. 17,5455 » » » 0,5950 » » bei 20° C.
5. 4,7231 » » » 0,3088 » » bei Siedetemperatur der gesättigten Lösung.
6. 18,7113 gr. alkoholischer Lösung enthielten 0,0135 gr. Leucin bei 17° C.
7. 5,7100 » » » » 0,0069 » » bei Siedetemperatur der gesättigten Lösung.

(Der Alkohol war in den beiden Fällen 99procentig.)

c) Hb-Leucin.

1. 26,5640 gr. Lösung enthielten 0,6248 gr. Leucin bei 16° C.
2. 17,4659 » » » 0,3730 » » bei 19° C.
3. 7,9947 » » » 0,4210 » » bei Siedetemperatur der gesättigten Lösung.
4. 7,7343 gr. Lösung enthielten 0,3779 gr. Leucin bei Siedetemperatur der gesättigten Lösung.

Folgende Tabelle enthält die vorstehend mitgetheilten Resultate im Mittel übersichtlich zusammengestellt:

1 Thl. Leucin.	Temperatur (im Mittel).	Theile Lösungsmittel (im Mittel).
Aus Hefe	19° C	28,8 Thl. Wasser
Aus Casëin	19° C	29 Thl. Wasser
Aus Hb-Eiweiss	19° C	45,8 Thl. Wasser
Aus Hefe	Siedetemp. der gesätt. Lösung	15,9 Thl. Wasser
Aus Casëin	Siedetemp. der gesätt. Lösung	14,3 Thl. Wasser
Aus Hb-Eiweiss	Siedetemp. der gesätt. Lösung	18,7 Thl. Wasser
Aus Casëin	17° C	1385 Thl. Alkohol von 99 %
Aus Casëin	Siedetemp. der gesätt. Lösung	826 Thl. Alkohol von 99 %

Ihr Verhalten zu polarisiertem Lichte wurde im Wild-schen Polaristrobometer untersucht, nachdem ca. 1—1,5 gr. Substanz in etwas mehr als der berechneten Menge Salzsäure gelöst und auf ca. 25 cbcm. verdünnt worden waren. Der Gehalt des Röhreninhalts an Leucin wurde sodann nach der Beobachtung genau festgestellt. Die Wägung der 200 mm. langen, erst leeren, sodann mit destilliertem Wasser von 4° erfüllten Röhre ergab ein Volumen derselben von 22,42 cbcm.

a) Hf-Leucin.

1. 0,9811 gr. Leucin-Chlorhydrat = 0,7673 gr. Leucin drehten im Mittel um 1,22° nach rechts, woraus $[\alpha_D]$ = 17°,8 = 17° 48.′
2. 1,1882 gr· Leucin-Chlorhydrat = 0,9301 gr. Leucin drehten im Mittel aus 10 Ablesungen um 1° 25′ nach rechts, woraus $[\alpha_D]$ = 17°,15 = 17° 9′.

b) C-Leucin.

1. 0,9910 gr. Leucin in Salzsäure gelöst und auf genau 25 cbcm. verdünnt, drehten im Mittel um 1° 22′ nach rechts, woraus $[\alpha_D]$ = 17°,17 = 17° 10′.
2. 0,9158 gr. Leucin-Chlorhydrat = 0,7168 gr. Leucin drehten im Mittel aus 10 Ablesungen um 1° 6′ nach rechts, woraus $[\alpha_D]$ = 17°,18 = 17° 11′.

c) Hb-Leucin.

1. 1,4028 gr. Leucin-Chlorhydrat = 1,0980 gr. Leucin drehten im Mittel von 20 Ablesungen um 1° 24′ nach rechts, woraus $[\alpha_D]$ = 14°,31 = 14° 18′.

2. 1,1187 gr. Leucin in 20 cbcm. Normal-Salzsäure gelöst und auf 26,00 cbcm. verdünnt, drehten im Mittel von 10 Ablesungen um 1° 14 nach rechts, woraus $[\alpha_D]$ = 14°,3 = 14° 18′.

Hierzu habe ich noch zu bemerken, dass ich geringere Werthe für das specif. Rotationsvermögen erhielt, wenn ich das aus Alkohol umkrystallisierte salzsaure Leucin in der der Concentration entsprechenden Menge Wassers löste und auf sein Drehungsvermögen untersuchte, als wenn ich nach der oben angegebenen Methode verfuhr.

Es drehten z. B. 0,9925 gr. aus Alkohol umkrystallisiertes salzsaures Leucin aus Hämoglobin-Eiweiss, entsprechend 0,7769 gr. Leucin, die in 22,42 cbcm. der Lösung, welche frei war von überschüssiger Salzsäure, enthalten waren, im Mittel von 10 Ablesungen um 0,61° nach rechts, was einem spec. Drehungswinkel von 8°,8 entspricht. Dieselbe Menge Substanz drehte dagegen nach Zugabe von 5 cbcm. Normal-Salzsäure im Mittel um 1°,0 nach rechts, und gab daher einen specif. Drehungswinkel von 14°,45, einen Werth, der dem obigen sehr nahe kommt. Weiterer Zusatz von Salzsäure brachte keine Steigerung mehr hervor. Dasselbe war auch bei den anderen Leucinen zu beobachten. Vielleicht muss man zur Erklärung dieser Erscheinung annehmen, dass das salzsaure Leucin in wässriger Lösung von geringer Concentration z. T. wohl dissociirt[1]) war in Salzsäure und Leucin, welch letzteres allein ja in wässriger Lösung nach links dreht und somit die Wirkung des salzsauren Leucins theilweise compensieren musste. Erst bei Gegenwart des nach dem Gesetz der Massenwirkung geforderten Ueberschusses an Salzsäure wird alles Leucin als salzsaures Leucin vorhandeu sein, und damit der normale Drehungswinkel erreicht werden.

Die im Mittel erhaltenen Werthe für das spec. Rotationsvermögen sind in folgender Tabelle wiedergegeben, wozu noch die Resultate früherer Beobachtungen beigefügt sind.

Ausgangsmaterial.	Concentr.	a	Apparat.	$[\alpha_D]$	Beobachter.
Conglutin (Salzsäurespaltung)	5 °/₀	+ 5°,0	S.-V.	+ 17°,3	Schulze.
Conglutin ($Ba(OH)_2$-spaltung)		inaktiv			»
Inaktives L. (durch Pen. gl. aktiv gem.)	4,37°/₀	— 4°,4	S.-V.	— 17°,4	»
Casëin (Salzsäurespaltung)	6,4418°/₀	+ 2°,26	W. P.	+ 17°,54	Mauthner.
C-Leucin (Salzsäurespaltung)	3,96°/₀	+ 1°,36	»	+ 17°,17	Gmelin.
Hf-Leucin (Fäulniss)	3,78°/₀	+ 1°,23	»	+ 17°,45	»
Hb-Leucin (Salzsäurespaltung)	4,89°/₀	+ 1°,4	»	+ 14°,31	»

[1]) Vergl. Curtius und Schulz, B. B. XXIII, 3041.

Diese 3 Leucine, aus Hefe, Casëin und Hämoglobineiweiss, führte ich sodann nach der auch von Schulze eingeschlagenen Methode durch Behandeln mit Natriumnitrit und Schwefelsäure in die entsprechenden Oxysäuren über. Durch Extraction mit Aether und öfteres Ueberführen in das schwerlösliche, grünblaue Kupfersalz wurde die Reinigung der Oxysäuren bewerkstelligt. Bei allen 3 Leucinen stellte die Oxysäure eine weisse, harte, strahlig krystallinische Masse dar, die in Wasser sehr leicht und vollständig löslich war. Die Ausbeute, die nur 37—40 % der angewandten Menge Leucin betrug, wurde wohl durch den Umstand beeinträchtigt, dass die salpetrige Säure zugleich eine oxydierende Wirkung ausübte und unter CO_2-Abspaltung einen Theil der Oxysäure in Valeriansäure überführte, die in der That auch durch den Geruch wahrnehmbar war.

Im Probierröhrchen erhitzt, geht die Leucinsäure in ihr öliges, in Wasser unlösliches Anhydrid über. Dasselbe bildet sich auch bei längerem Erhitzen auf dem Wasserbade, kann aber durch Lösen in Natronlauge und Ansäuern mit Essigsäure leicht wieder in die Oxysäure zurückverwandelt werden.

Die Schmelzpunkte wurden bei den aus Casëin und Hefe gewonnenen Leucinsäuren konstant bei 72°,5 C gefunden, während die aus Hämoglobineiweiss erhaltene Oxysäure selbst nach weiteren Reinigungsversuchen schon bei 67° zu schmelzen begann.

Die Elementaranalysen, sowie die Analysen der Kupfersalze, des Zink- und Kalksalzes gaben folgende Werthe:

Hf-Leucin.

1. 0,3134 gr. Subst. (im Vacuum unter Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet) gaben 0,6257 gr. CO_2 und 0,2613 gr. H_2O.
2. 0,3040 gr. Kupfersalz gaben 0,0744 gr. Cu_2S.

C-Leucin.

3. 0,4703 gr. Subst. gaben 0,9385 gr. CO_2 und 0,3932 gr. H_2O.
4. 0,5926 gr. Kupfersalz gaben 0,1458 gr. Cu_2S.

Hb-Leucin.

5. 0,3239 gr. Subst. gaben 0,6478 gr. CO_2 und 0,2687 gr. H_2O.
6. 0,9590 gr. Kupfersalz gaben 0,2348 gr. Cu_2S.

7. 0,9084 gr. Zinksalz (aus wässrigem Alkohol umkrystallisiert und über Schwefelsäure getrocknet) gaben bei 105°—110° 0,0240 gr. Verlust = 2,64 %, entsprechend 1/2 Mol. Krystallwasser[1]), 0,8844 gr. Zinksalz (bei 105°—110° getrocknet) gaben 0,2562 gr. ZnS.

8. 0,4646 gr. Kalksalz (über Schwefelsäure getrocknet) gaben bei 105° 0,0486 gr. Verlust = 10,46 %, entsprechend 2 Mol. Krystallwasser[2]), 0,4160 gr. Kalksalz (bei 105° getrocknet) gaben 0,0750 gr. CaO.

Hf-L.	C-L.	Hb-L.	Berechnet auf:	
C = 54,44 %	54,42 %	54,54 %	54,54 %	$C_6H_{12}O_3$
H = 9,26	9,28	9,21	9,09	
O = 36,30	36,30	36,25	36,37	
Cu = 19,54	19,65	19,55	19,50	$(C_6H_{11}O_3)_2Cu$
Zn = --	—	19,41	19,87	$(C_6H_{11}O_3)_2Zn$
Ca = —	—	12,86	13,24	$(C_6H_{11}O_3)_2Ca$

Das specifische Drehungsvermögen der 3 Oxysäuren wurde ebenfalls im Wild'schen Polaristrobometer und zwar nach derselben Methode wie beim Leucin festgestellt. Als Lösungsmittel diente Wasser. Der Röhreninhalt musste stets im Vacuum unter Schwefelsäure eingetrocknet werden, da beim Abdampfen auf dem Wasserbade ein Verlust unvermeidlich gewesen wäre.

a) Leucinsäure aus Hf-Leucin.

1. 2,0831 gr. Subst. drehten im Mittel von 10 Ablesungen um 51' nach links, woraus $[\alpha_D] = -4°,34'$.

b) Leucinsäure aus C-Leucin.

1. 2,7816 gr. Subst. drehten im Mittel von 10 Ablesungen um 1°,12' nach links, woraus $[\alpha_D] = -4°,50'$.
2. 4,4271 gr. Subst. drehten im Mittel von 10 Ablesungen um 1°,34' nach links, woraus $[\alpha_D] = -3°,58'$.

c) Leucinsäure aus Hb-Leucin.

1. 2,7284 gr. Subst. drehten im Mittel von 10 Ablesungen um 2°,38' nach links, woraus $[\alpha_D] = -10°,48'$.
2. 2,7543 gr. Subst. drehten im Mittel von 6 Ablesungen um 2°,30' nach links, woraus $[\alpha_D] = -10°,10'$.

---

[1]) Waage, Annal. d. Chem. u. Pharm., 118, S. 287, findet ebenfalls 1/2 Mol., dagegen Thudichum, J., 1861, S. 780, 1 Mol.

[2]) Analysen des Kalksalzes sind von Waage nicht angegeben.

Die Löslichkeitsbestimmungen der mit neutralem Zinkacetat gefällten und aus wässrigem Alkohol umkrystallisierten Zinksalze ergaben folgende Werthe:

a) aus Hf-Leucin.

1. 11,4089 gr. Lösung enthielten 0,0390 gr. Salz bei 19° C.
2. 6,8402 » » » 0,0346 » » bei Siedetemperatur der gesättigten Lösung.

b) aus C-Leucin.

1. 11,0208 gr. Lösung enthielten 0,0370 gr. Salz bei 19°,5 C.
2. 7,7214 » » » 0,0386 » » bei Siedetemperatur der gesättigten Lösung.

c) aus Hb-Leucin.

1. 9,9714 gr. Lösung enthielten 0,0341 gr. Salz bei 19° C.
2. 9,1790 » » » 0,0309 » » bei 21° C.
3. 6,8216 » » » 0,0382 » » bei Siedetemperatur der gesättigten Lösung.
4. 8,8930 gr. Lösung enthielten 0,0385 gr. Salz bei Siedetemperatur der gesättigten Lösung.

Eine vergleichende Uebersicht über die Eigenschaften der Oxycapronsäuren und ihrer Salze gibt folgende Tabelle:

	Smp.	Specif. Rotations-vermögen.	Krystallwasser des Zinksalzes.	Löslichkeit des Zinksalzes.	Beobachter.
α-Oxynormal-capronsäure	60°-62°	inaktiv	2 H_2O	1:681 (16°) 1:470 (100°)	Jelisafow, Journ. d. russ. Ch. Ges. 12, 367; 9, 131.
α-Oxyisobutylessigsäure	54°-55°	inaktiv	2 H_2O	0,121:100 (16°)	Guthzeit, A. Ch. Pharm. 209, 239.
aus inaktivem Leucin	50°-52°	inaktiv	—	schwer löslich	Schulze, B. B. XXIV, S, 669.
aus aktivem Leucin	73°	—	1/2 H_2O (Waage) 1 H_2O (Thudicum)	1:300 (16°) 1:204 (100°)	Waage, A. Chem. Pharm. 118, 207.
aus Hf-Leucin	72°,5	—4°,57	—	1:291,5 (100°) 1:197 (100°)	Gmelin.
aus C-Leucin	72°,5	—4°,4	—	1:297 (19°) 1:199 (100°)	Gmelin.
aus Hb-Leucin	67°-70°	—10°,5	1/2 H_2O	1:294 (20°) 1:204 (100°)	Gmelin.

Die Reduktion der Oxysäuren zu den Fettsäuren wurde zuerst analog der von Lautemann[1]) bei der Milchsäure angewandten Methode durch Erhitzen der Leucinsäure mit Jodwasserstoffsäure in der Retorte vorzunehmen versucht. Allein 2 Versuche, in dieser Weise angestellt, das eine Mal bei 4-, das andere Mal bei 6stündigem Erhitzen am Rückflusskühler, hatten einen negativen Erfolg. Das Reaktionsprodukt, das nach dem Entfärben mit schwefliger Säure im Scheidetrichter mit Wasser gut gewaschen und so von der Jodwasserstoffsäure getrennt wurde, ging nach dem Lösen in Natronlauge und Ansäuern mit Essigsäure nahezu vollständig in Wasser über, ein Beweis, dass noch unveränderte Oxysäure vorhanden war. Ausserdem stimmten die Analyse, sowie die Löslichkeit des aus der erhaltenen Säure dargestellten Zinksalzes ziemlich annähernd auf das Zinksalz der Oxycapronsäure.

Es wurde desshalb die Reduktion im geschlossenen Rohre vorgenommen. Dabei kamen zweimal je 3,6 gr. der Oxysäure aus Hämoglobineiweiss, 3,5 gr. aus Casëin und 4,4 gr. aus Hefe zur Verwendung. Dieselben wurden je mit 15—20 cbcm. bei 0° rauchender Jodwasserstoffsäure und 0,5—1 gr. überschüssigem gelbem Phosphor in eine Röhre eingeschmolzen und im Schiessofen auf 140° erhitzt. Nach 6stündigem Erhitzen war der Phosphor in einigen der Röhren ganz, in den andern grösstentheils verschwunden. Der Röhreninhalt stellte nach dieser Zeit eine nahezu farblose Flüssigkeit dar, auf welcher etwa 4—5 cbcm. eines ganz schwach gelblich gefärbten Oeles schwammen. Weiteres 6stündiges Erhitzen veränderte das Aussehen des Röhreninhaltes nicht mehr.

Eine Probe des vom etwa noch vorhandenen Phosphor, sowie von der Jodwasserstoffsäure scharf getrennten, ganz schwach gelblich gefärbten Oeles schied sich nach dem Lösen in Natronlauge, was übrigens nur langsam vor sich ging, und nachherigem Ansäuern mit Essigsäure vollständig wieder ab, während in dem wässrigen Rückstand, worin sich etwa noch unveränderte Oxysäure hätte befinden können, letztere mit

---

[1]) Annal. d. Chem. u. Pharm. 113, S. 217 (1860).

Kupferacetat nicht mehr nachzuweisen war. Es ging somit auf diese Weise die Reduktion vollständig glatt vor sich.

Das Oel selbst wurde, nachdem es mit etwas schwefliger Säure vollständig entfärbt, mit Wasser gut gewaschen und sodann mit Aether extrahiert worden war, nach dem Abdestillieren des Aethers mit grossem Ueberschuss von Kalkmilch lange Zeit in der Wärme digeriert, solange, bis es in Lösung gebracht werden konnte. Nachdem vom überschüssigen Kalk abgesaugt, das Filtrat mit Oxalsäure genau neutralisiert und der oxalsaure Kalk entfernt worden war, lieferte die Lösung beim Eindunsten im Vacuum unter Schwefelsäure weisse, schuppig-blättrige Massen mit einzelnen radialfasrigen Krystalldrusen. Auf dem Wasserbad eingedunstet zersetzt sich die Lösung, indem sie unter Verlust von Fettsäure bald alkalische Reaktion annimmt.

Die im Vacuum bis zu wenigen Cubiccentimetern eingeengte Lösung wurde von dem ausgeschiedenen Kalksalze abgesaugt, und der Filterrückstand solange mit kaltem Wasser ausgewaschen, bis das Filtrat sich frei von dem etwa noch in Spuren vorhandenen Jodcalcium erwies. In einem Falle, als sich das Kalksalz in Folge von Zersetzung des Jodcalciums etwas gelblich gefärbt hatte, konnte das Jod durch Schütteln der Lösung mit wenig fein vertheiltem Quecksilber entfernt werden. Es stellte das Kalksalz zwischen Fliesspapier getrocknet glänzend weisse, blättrige, weiche Krusten dar, die unter dem Mikroskop die oben genannte Struktur zeigten.

Zur Identifizierung der Fettsäure wurde das Kalksalz gewählt, weil dasselbe nach den Untersuchungen von Lieben und Rossi[1]) in seinem Krystallwassergehalt und in seiner Löslichkeit in Wasser charakteristische Merkmale aufweist.

Das Salz wurde zunächst zwischen Fliesspapier und sodann bei gewöhnlichem Luftdruck unter Schwefelsäure lufttrocken gemacht, wobei sein Gewicht konstant blieb. Im Vacuum schien es dagegen unter Schwefelsäure nach 36 Stunden einen Theil des Krystallwassers zu verlieren.

---

[1]) Annal. d. Chem. u. Pharm. 165, S. 118.

Analysen der Kalksalze der erhaltenen Fettsäuren.

a) aus Hf-Leucin.

1. 0,0699 gr. des über Schwefelsäure getrockneten Salzes verloren bei 105° 0,0105 gr. Wasser = **15,02** %.
   0,0594 gr. wasserfreies Salz gaben mit Schwefelsäure abgeraucht 0,0294 gr. $CaSO_4$ = **14,54** % Ca, oder auf die Krystallwasser haltende Subst. berechnet = **12,36** % Ca.
2. 0,6368 gr. lufttrockenes Salz verloren bei 105° 0,0950 gr. H_2O = **14,91**%.
   0,5418 gr. wasserfreies Salz gaben 0,2686 gr. $CaSO_4$ = **14,57** % Ca, oder auf die Krystallwasser haltende Subst. berechnet = **12,40** % Ca.

b) aus C-Leucin.

0,2438 gr. lufttrockenes Salz verloren bei 105° 0,0380 gr. H_2O = **15,57** %. 0,2058 gr. wasserfreies Salz gaben 0,1034 gr. $CaSO_4$ = **14,77** % Ca oder auf Krystallwasser haltende Subst. berechnet = **12,47** % Ca.

c) aus Hb-Leucin.

1. 0,1686 gr. lufttrockenes Salz verloren bei 105° 0,0270 gr. H_2O = **16,01**%.
   0,1416 gr. wasserfreies Salz gaben 0,0704 gr. $CaSO_4$ = **14,62** % Ca oder auf Krystallwasser haltende Subst. berechnet = **12,28** % Ca.
2. 0,2981 gr. lufttrockenes Salz verloren bei 105° 0,0527 gr. H_2O = **17,67** %.
   0,2454 gr. wasserfreies Salz gaben 0,1232 gr. $CaSO_4$ = **14,76** % Ca oder auf Krystallwasser haltende Subst. berechnet = **12,15** % Ca. (Es mögen hier vielleicht beim Trocknen Spuren von Capronsäure entwichen sein).

Löslichkeitsbestimmungen obiger Kalksalze.

Die Löslichkeit wurde wie früher bestimmt, und eine gesättigte Lösung durch Eindunsten unter Schwefelsäure, bis zur reichlichen Abscheidung des Salzes, dargestellt.

a) aus Hf-Leucin.

4,3825 gr. Lösung enthielten 0,5878 gr. bei 105° getrocknetes Salz bei 15°; 100 Thl. Lösung enthielten somit **13,4** Thl. wasserfreies Salz.

b) aus C-Leucin.

2,0830 gr. Lösung enthielten 0,2058 gr. bei 105° getrocknetes Salz bei 12°; 100 Thl. Lösung enthielten somit **9,88** Thl. wasserfreies Salz.

c) aus Hb-Leucin.

1. 1,4469 gr. Lösung enthielten 0,1416 gr. bei 105° getrocknetes Salz bei 18°; 100 Thl. Lösung enthielten somit **9,78** Thl. wasserfreies Salz.
2. 2,7950 gr. Lösung enthielten 0,3165 gr. bei 105° getrocknetes Salz; 100 Thl. Lösung enthielten somit **11,32** Thl. wasserfreies Salz.

Um den Vergleich zu erleichtern, folgt eine tabellarische Zusammenstellung meiner Resultate und der Werte, wie sie

für den Krystallwassergehalt und die Löslichkeit der Kalksalze sowohl von der Normalcapronsäure als der Isobutylessigsäure von Lieben und Rossi festgestellt wurden.

Säure des Kalksalzes.	Krystall-wassergehalt in %	Ca %	100 Thl. Lösung enthalten.	Temperatur.
Normale Capronsäure: . .	6,25	13,89	2,7	18°,5 C
Isobutylessigsäure	16,67	12,34	11,3	19° C
Capronsäure aus Hf-Leucin	14,96	12,38	13,4	15° C
Capronsäure aus C-Leucin .	15,57	12,47	9,88	12° C
Capronsäure aus Hb-Leucin	16,84	12,21	11,32	18° C

Die Uebereinstimmung der Eigenschaften der Kalksalze von allen 3, aus Hefe, Casëin und Hämoglobineiweiss gewonnenen Fettsäuren mit denjenigen, die Lieben und Rossi für isobutylessigsauren Kalk gefunden haben, ist eine solche, dass an der Identität der 3 Fettsäuren mit der Isobutylessigsäure nicht zu zweifeln ist. Wenn auch diese Uebereinstimmung keine absolut vollständige ist, so muss doch jedenfalls die normale Capronsäure für meine Leucine ganz ausser Frage kommen, da, wie man aus der Tabelle sieht, das Kalksalz dieser Fettsäure von den von mir untersuchten Kalksalzen in seinen Eigenschaften viel zu weit abweicht.

Folgerungen aus den vorstehend mitgetheilten Beobachtungen.

Vergleicht man die in den jeweiligen tabellarischen Uebersichten gegebenen Resultate bezüglich der Eigenschaften der 3 von mir untersuchten Leucine sowohl, als auch der entsprechenden Oxysäuren, bzw. ihrer Derivate, miteinander und mit den Angaben anderer Autoren, so ergeben sich nicht unerhebliche Differenzen.

Während die aus Hefe und Casëin gewonnenen Leucine, bzw. Oxysäuren, untereinander eine solche Uebereinstimmung zeigen, dass sie entschieden als identisch anzusehen sind, findet man bei dem aus dem Hämoglobineiweiss stammenden Leucin, ausgenommen die Löslichkeit seines oxycapronsauren Zinks, durchgehends auffallende Abweichungen;

Abweichungen, die wohl am schärfsten bei der Löslichkeit des Leucins selbst, sowie bei dem specifischen Rotationsvermögen seiner Oxysäuren zu Tage treten.

Andererseits aber hat sich ergeben, dass das aus Casëin und Hefe stammende Leucin in Bezug auf seine Löslichkeit zwar mit dem von Zollikofer und Mulder aus Nackenband und Leim dargestellten Leucin übereinstimmt, nicht aber mit dem von Schulze aus Pflanzeneiweiss durch Salzsäurespaltung erhaltenen Präparat, das dafür das gleiche specifische Drehungsvermögen besitzt, wie das letztere; während umgekehrt das aus Hämoglobineiweiss dargestellte Leucin allerdings ein geringeres Rotationsvermögen[1]), allein dafür genau die gleiche Löslichkeit zeigt, wie Schulze's Präparat.

Die Angaben von Waage und Thudichum ferner über die Eigenschaften der Leucinsäure stimmen, ausgenommen den niedrigeren Schmelzpunkt der aus Hämoglobineiweiss gewonnenen Oxysäure, mit den Beobachtungen, die ich an meinen eigenen, wie wir sahen, aktiven, 3 Oxysäuren gemacht habe, vollkommen überein; wobei allerdings hervorzuheben ist, dass Angaben über das specifische Drehungsvermögen der von den oben genannten Forschern untersuchten Leucinsäure nicht vorliegen. Hingegen zeigen einerseits die inaktive α-Oxyisobutylessigsäure, ebenso wie die mit ihr identische von Schulze aus inaktivem Leucin dargestellte Leucinsäure, andererseits die α-Oxynormalcapronsäure in jeder Beziehung ein vollständig verschiedenes Verhalten.

Wir setzen voraus, dass die angegebenen Differenzen nicht etwa die Folge von hartnäckig anhaftenden Verunreinigungen der Substanz sind, eine Voraussetzung, zu der mir die sorgfältigste Reinigung des Materials, sowie besonders

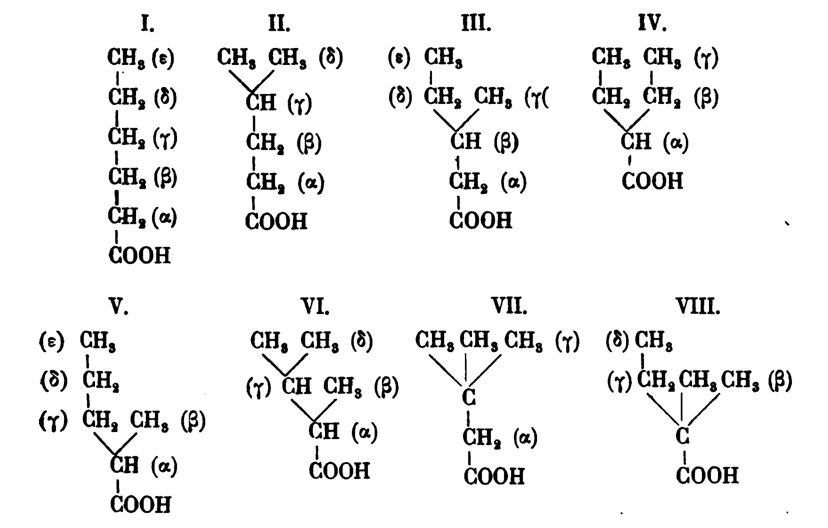
[1]) Jedoch findet Schulze, B. B. XXIV, 669, für die II. Fraction des aus der inactiven α-Amidoisobutylessigsäure durch Pilzaussaat entgegengesetzt aktiv gemachten Leucins ein specif. Drehungsvermögen von —14°,4; es war demnach das Linksdrehungsvermögen dieser Fraction, der offenbar noch einige Antheile der Rechtsmodification anhingen, ebensogross, wie das Rechtsdrehungsvermögen des von mir aus Hämoglobineiweiss gewonnenen Präparats.

meine analytischen Resultate alle Berechtigung geben, und vergegenwärtigen uns die Zahl der Möglichkeiten, welche eine Isomerie der Amidocapronsäuren und ein verschiedenes Verhalten der einzelnen Isomeren bedingen können.

Die Ursache der Verschiedenheiten kann liegen:

1. in der sogenannten Kettenisomerie, d. h. der verschiedenen Constitution der den Capronsäurederivaten zu Grunde liegenden Fettsäuren selbst;
2. in einer blossen Stellungsisomerie, insofern die Amidogruppe bei einer bestimmten Capronsäure selbst wieder an verschiedenen Kohlenstoffatomen sitzen kann;
3. in der sogenannten physikalischen Isomerie, worunter eine verschiedene räumliche Anordnung der Atome, bzw. Atomgruppen, um ein asymmetrisches Kohlenstoffatom zu verstehen ist.

Zur besseren Uebersicht der bezüglichen Isomerieverhältnisse stelle ich hier die bekannten Schemata der einzelnen Capronsäuren zusammen. Die theoretisch denkbaren 8 Capronsäuren, von denen allerdings nur 7 wirklich bekannt sind, sind folgende:



Man sieht, dass aus Säure

I.	der Normalcapronsäure	5,
II.	der Isobutylessigsäure	4,
III.	der Methyl-Aethyl-Proprionsäure .	5,
IV.	der Diäthyl-Essigsäure	3,
V.	der Methyl-Normal-Propyl-Essigsäure	5,
VI.	der Methyl-Iso-Propyl-Essigsäure .	4,
VII.	der Trimethylpropionsäure . . .	2,
VIII.	der Aethyl-Dimethyl-Essigsäure . .	3,

im Ganzen somit 31 isomere Amidosäuren abgeleitet werden können.

Was nun die Kettenisomerie betrifft, so haben sowohl Schulze's, wie meine eigenen Untersuchungen zweifellos dargethan, dass die den betreffenden Leucinen zu Grunde liegende Fettsäure die Isobutylessigsäure ist. Der fernere Gedanke an die Kettenisomerie ist demnach ausgeschlossen.

Mit Rücksicht auf die Stellungsisomerie können nun von der Isobutylessigsäure noch 4 Amidosäuren abgeleitet werden. Allein von diesen müssen diejenigen unberücksichtigt bleiben, bei welchen sich die Amidogruppe in γ- oder δ-Stellung befindet, da man in diesem Falle bei der Darstellung der Leucinsäure aus den natürlichen Leucinen Laktone erhalten müsste, ein Umstand, der bisher nicht beobachtet wurde. Ebenso erscheint die β-Stellung der Amidogruppe als unwahrscheinlich, da man bis jetzt noch nicht beobachtet hat, dass die aus einem Leucin gewonnene Oxysäure beim Erhitzen für sich oder mit Säuren in die ungesättigte Säure der Acrylsäurereihe übergeht, eine Reaction, die für die β-Oxysäuren charakteristisch ist. Die ε-Stellung der Amido- bzw. Hydroxyl-Gruppe endlich ist, wie es scheint, überhaupt noch bei keiner Fettsäure beobachtet worden. Wir sind demnach zu der Annahme gezwungen, dass dem Leucin die Constitution der α-Amidoisobutylessigsäure zukommt. Es fällt also die Stellungsisomerie ebenfalls als Erklärungsgrund für die an Leucinen verschiedenen Ursprungs beob-

achteten Differenzen hinweg, und es bleibt somit als Ursache der letzteren nur noch die physikalische Isomerie übrig.

Es stellen in der That die 3 von mir untersuchten Leucine und wohl auch das von Schulze aus Pflanzeneiweiss mit Salzsäure gewonnene das complementäre Spiegelbild jener Linksmodification dar, welche Schulze durch Pilzaussaat aus der inactiven α-Amidoisobutylessigsäure erzeugt hat.

Die bei den Leucinen einer und derselben Darstellungsweise vorhandenen Differenzen werden dadurch erklärt werden müssen, dass man es jedenfalls durchaus nicht immer mit blos einer Modification, sondern mit einem jeweils wechselnden Gemenge beider Modificationen zu thun hat.

Es liegt sehr nahe anzunehmen, dass wie das Drehungsvermögen, so auch die Löslichkeitsverhältnisse eines Präparats sich ändern werden, sobald dasselbe aus einem wechselnden Gemenge optisch activer Modificationen besteht.

Lässt sich nämlich nachweisen, dass das inactive Leucin, das ja ein Drehungsvermögen = 0, sowie die geringste Löslichkeit (1 : 106 Th. Wasser) besitzt, nicht eine einheitliche Verbindung, sondern ein Gemenge gleicher Theile von beiden optisch activen Modificationen darstellt, so muss daraus geschlossen werden, dass in der That die beiden optischen Modificationen sich gegenseitig beeinflussen. Und zwar ist höchst wahrscheinlich die gegenseitige Beeinflussung eine derartige, dass je mehr die eine oder die andere Modification in einem Gemenge vorherrscht, um so mehr das Drehungsvermögen nach einer der beiden Seiten merklich werden und wachsen und auch die Löslichkeit zunehmen muss.

Ob nun in der That das inactive Leucin nur ein molekulares Gemenge — analog der Traubensäure in verdünnten Lösungen, nach den Bestimmungen von Raoult[1]) — der beiden activen Modificationen, oder ob es eine Verbindung der beiden entgegengesetzt drehenden Moleküle zu einem Ganzen darstellt, suchte ich durch Molekulargewichtsbestimmungen festzustellen.

---

[1]) Raoult, Z. f. physik. Chem. 1887, 1, 816.

Diese Molekulargewichtsbestimmungen, an einer Reihe von Amidosäuren ausgeführt, boten ausserdem noch ein weiteres Interesse, indem sie nämlich zugleich Aufschluss gaben über die Frage, ob nicht etwa der bekannte Indifferentismus überhaupt aller Amidosäuren zurückzuführen sei auf eine gegenseitige Verbindung zweier Einzelmoleküle zu einem Doppelmolekül von etwa folgender Form, wovon das Leucin als Beispiel gewählt ist.

$$\begin{array}{l} H_2 = N - C_5H_{10} - COOH \\ \quad\;\;\; \wedge \qquad\qquad\quad \vee \\ \quad\;\; HOOCC_5 - H_{10} - N = H_2. \end{array}$$

Molekulargewichtsbestimmungen.

Zu den Molekulargewichtsbestimmungen bediente ich mich des kryoskopischen Verfahrens.

Die synthetisch dargestellte Amidoisobutylessigsäure konnte allerdings zu den Versuchen wegen ihrer geringen Löslichkeit in Wasser nicht benützt werden. Dagegen eignete sich hiezu besser ihre aus Bromcapronsäure (wahrscheinlich Normalcapronsäure) nach Hüfner dargestellte Isomere, die ja gleichfalls optisch inactiv, dabei aber $2^1/_3$mal löslicher in Wasser (1 : 46) ist, als die erstere.

Als Lösungsmittel diente Wasser, da die Leucine in den sonst gebräuchlichen Lösungsmitteln, Essigsäure, Phenol, höheren Fettsäuren etc. in der Kälte nicht oder nur sehr wenig löslich sind. Es konnten jedoch von vornherein nur annähernde Werthe erwartet werden, da in Folge der geringen möglichen Concentration der Werth für die Gefrierpunktserniedrigung sehr klein ausfallen musste.

1. Eine Lösung von 0,1094 gr. Subst. in 15 gr. Wasser ergab eine Gefrierpunktserniedrigung von 0°,11. Daraus berechnet sich, wenn man für die molekulare Gefrierpunktserniedrigung des Wassers die nach der van t'Hoff'schen Gleichung berechnete Constante 18,9 zu Grunde legt, das Molekulargewicht des Leucins zu 125 (statt 131 = $C_6H_{13}NO_2$).
2. Eine Lösung von 0,1646 gr. in 16,465 gr. Wasser (eine beim Gefrierpunkt gesättigte Lösung) ergab als Gefrierpunktserniedrigung 0°,17, woraus das Molekulargewicht = 111 sich berechnet.

Wenngleich hier zwischen dem wirklichen und dem gefundenen Molekulargewicht eine bedeutende Differenz vorliegt, so ergibt sich doch gerade aus der negativen Differenz um so mehr, dass diese Amidosäure in den Lösungen von den angegebenen Concentrationen als Einzelmolekül vorhanden ist, und somit auch die Amidoisobutylessigsäure, da sie nur Lösungen von noch weit geringerer Concentration zu bilden im Stande ist, in denselben aus einem Gemenge der beiden Modificationen und nicht als Doppelmolekül bestehen muss.

Es wurde ferner bei dem vollständig analogen, optisch inactiven Alanin, das wegen seiner grossen Löslichkeit in Wasser ein geeigneteres Material bildet, die Molekulargrösse festgestellt und auch hier noch bei einer 4procentigen Lösung einfach gefunden.

1. Eine Lösung von 0,2840 gr. in 15 gr. Wasser gab als Gefrierpunktserniedrigung 0°,44, woraus sich das Molekulargewicht zu 82 berechnet.
2. Eine Lösung von 0,4673 gr. in 15 gr. Wasser gab als Gefrierpunktserniedrigung 0°,70, woraus sich das Molekulargewicht zu 84 berechnet.
3. Eine Lösung von 0,6603 gr. in 15 gr. Wasser gab als Gefrierpunktserniedrigung 0°,98, woraus sich das Molekulargewicht zu 85 berechnet.

(Alanin = $C_3H_7NO_2$ = 89).

Hieran schliesse ich noch die Bestimmung des Molekulargewichtes von Glycocoll[1]) = $C_2H_5NO_2$ = 77.

Als Lösungsmittel diente ebenfalls Wasser.

1. Eine Lösung von 0,1726 gr. in 14,7 gr. Wasser gab als Gefrierpunktserniedrigung 0°,31, woraus sich das Molekulargewicht zu 71,5 berechnet.
2. Eine Lösung von 0,5151 gr. in 14,7 gr. Wasser gab als Gefrierpunktserniedrigung 0°,76, woraus sich das Molekulargewicht zu 87 berechnet.

Aus diesen Resultaten geht hervor, dass auch das Glycocoll noch in $3^1/_2$procentigen Lösungen als Einzelmolekül vorhanden ist.

---

[1]) Vergl. Curtius und Schulz, B. B. XXIII, 3041.

Zur Uebersicht stelle ich in folgender Tabelle die gefundenen und berechneten Molekulargewichte der betreffenden Amidosäuren zusammen.

Amidosäure.	Molekulargewicht.		
	Gefunden:		Berechnet.
	Einzelwerth.	Mittelwerth.	
Glycocoll $C_2H_5NO_2$ . . .	a) 71,5 b) 87	79,2	77
Alanin $C_3H_7NO_2$	a) 82 b) 84 c) 85	83,66	89
Leucin $C_6H_{13}NO_2$	a) 125 b) 111	118	131

Allgemein darf nun wohl nach diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass in den verdünnten Lösungen der Amidosäuren eine gegenseitige Bindung der Moleküle nicht stattfindet.

Zur Kenntniss der Thiercellulose oder des Tunicins.

Von

E. Winterstein.

(Aus dem agricultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaction zugegangen am 12. März 1893.)

Bekanntlich bestehen die Mäntel der Tunicaten zum grossen Theil aus einer stickstofffreien Substanz, die zuerst von C. Schmidt[1]) isolirt und später von Berthelot[2]) mit dem Namen Tunicin bezeichnet wurde. C. Schmidt[3]) verwendete für seine Versuche die häutigen Hüllen der Ascidia mammillaris, dieselben wurden successive mit Wasser, Alkohol, Aether, verdünnten Säuren und Alkalien behandelt; nach dieser Behandlung hinterblieb eine farblose stickstofffreie Substanz, dieselbe erwies sich unlöslich in Salpetersäure, Salzsäure, Essigsäure und concentrirter Kalilauge. In concentrirter Salpetersäure oder concentrirter Schwefelsäure löste sie sich langsam auf. Mit Wasser unter Druck bei 200° erhitzt blieb sie unverändert. Die Elementaranalyse ergab, nach Abzug der Asche, folgende Resultate: C — 45.38 %, H — 6.47 %. Diese Zahlen stimmen mit den für Pflanzencellulose gefundenen annähernd überein. Veranlasst durch die Mittheilung C. Schmidt's nahmen Löwig und Kölliker[4]) ein Jahr später diesen Gegenstand wieder auf und untersuchten mehrere Species der ver-

---

[1]) Ann. der Chem. u. Pharm., Bd. 54, S. 318.

[2]) Ann. de chim. phys. 1859, Bd. 56, S. 149; Compt. rend. 47, S. 227.

[3]) Loc. cit.

[4]) Journ. f. prakt Chem., Bd. 37, S. 439; Ann. des sciences nat III Série, Bd. 5, S. 193.

schiedenen Tunicatengattungen[1]). Sie fanden, dass beim Behandeln der Thiere mit verdünnten Laugen und Säuren dieselben ihre äussere Form vollständig beibehalten und nach genügender Einwirkung der Reagentien eine stickstofffreie Substanz hinterlassen; dieselbe haben sie dann aus den in kleine Stücke zerschnittenen Mänteln durch angegebene Behandlung isolirt. Bei der Elementaranalyse der aus den Mänteln von Ascidia mammillaris und Cynthia papillata dargestellten Präparate erhielten sie folgende Zahlen: C — 43,40 %. H — 5,68 % bezw. C = 43,20 %. H — 6,16 %

Weitere Untersuchungen hat Payen[2]) im Verein mit Dumas, Boussingnault und Milne Edwards ausgeführt. Sie verwendeten dafür die Mäntel von Phallusia intestinalis, dieselben wurden wiederholt mit Kalilauge vom spec. Gewicht 1,02 und Salzsäure vom specif. Gewicht 1,06 behandelt und schliesslich mit Wasser ausgewaschen, der nach dieser Extraction verbleibende Rückstand enthielt jedoch im Mittel noch gegen 3 % Stickstoff und erst nach längerem Digeriren mit genannten Agentien bekamen sie eine stickstofffreie Substanz, die folgende Zusammensetzung hatte: C — 44,5 % H 6,4 % sie war unlöslich in concentrirter HNO_3, wurde mit alkoholischer Jodlösung gelb gefärbt, diese Färbung ging beim Betupfen mit concentrirter Schwefelsäure in violette Farbe über, weiter constatirten sie die Löslichkeit ihres Präparats in concentrirter Schwefelsäure, wobei eine dextrinähnliche Masse resultirte, welche wegen Mangel an Material nicht weiter untersucht wurde.

Während die genannten Forscher die von ihnen dargestellte Thiercellulose mit der Pflanzencellulose für identisch betrachteten, glaubte Berthelot eine Verschiedenheit aufgefunden zu haben. Berthelot untersuchte die Mäntel von Cynthia papillata; um daraus die stickstofffreie Substanz zu

[1]) Es gelangten folgende Species zur Untersuchung: Phallusia mammillaris, Phallusia intestinalis, Phallusia monachus, Cynthia papillata, Clavelina lepadiformis, Diazona violacea, Botryllus polycyclus, Pyrosoma giganteum, Salpa maxima.

[2]) Annales des sciences naturelles III Série, Bd. 5.

isoliren wurden die Mäntel einige Stunden mit concentrirter Salzsäure gekocht, alsdann mit kochender 30 proc. Kalilauge[1]) behandelt. Letztere wurde durch Decantiren entfernt und der unlösliche Rückstand mit destillirtem Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaction ausgewaschen. Er beschreibt die erhaltene Substanz[2]) als eine weisse durchscheinende Masse von hornartiger Beschaffenheit, unlöslich in allen Lösungsmitteln. In feuchtem Zustand geschmeidig wie Handschuhleder. Unter dem Mikroskop zeigte sie fasrige Structur analog dem Thiergewebe; diese Eigenschaft betrachtet Berthelot als eine Verschiedenheit von der Pflanzencellulose; ferner unterscheidet sie sich nach seiner Ansicht von der Pflanzencellulose durch die bedeutendere Widerstandsfähigkeit gegen Säuren und durch die schwächere Blaufärbung, welche mit Jod und concentrirter Schwefelsäure auftritt. «Da der Stoff» schreibt Berthelot[1]) «in Bezug auf seine physikalischen Eigenschaften, Structur und chemischen Charakter von der Pflanzenfaser ganz verschieden ist, habe ich für nöthig gefunden, um Irrthum zu vermeiden, ihn mit einem bezeichneten Namen zu belegen und nannte ihn Tunicin».

Eine Zusammenstellung der bis dahin erschienenen Arbeiten, sowie einige neue Beiträge über die Thiercellulose lieferte Schäfer[3]). Zur Untersuchung gelangten hauptsächlich Pyrosomen, einige Salpen und mehrere Exemplare von Phallusia mammillaris. Die Isolirung der fraglichen Substanz geschah im wesentlichen nach den schon vorliegenden Angaben: die Mäntel wurden einige Tage lang unter erhöhtem Druck im Papinschen Topf gekocht, behufs Entfernung der anorganischen Bestandtheile längere Zeit mit verdünnter Salzsäure gekocht, die stickstoffhaltigen Körper wurden durch mehrtägiges Kochen mit concentrirter Kalilauge ausgezogen und zwar wurde so lange gekocht bis sich beim Schmelzen der Substanz mit metallischem Kalium kein Stickstoff mehr nach-

---

[1]) In der Originalarbeit heisst es Lauge von 32° und 32grädige Lauge enthält 30 % KHO.

[2]) Die Elementaranalyse ergab 44,6 % C, 6.1 % H.

[3]) Ann. der Chemie und Pharm., Bd. 160, S. 312.

weisen liess; der verbleibende Rückstand wurde nun vollständig mit Wasser ausgewaschen und schliesslich mit Alkohol behandelt. Schäfer beschreibt die erhaltene Cellulose als eine weisse durchsichtige Masse, die in ihrer Beschaffenheit eine Aehnlichkeit mit starkem Papier aufweist; mit Jod und Schwefelsäure nahm sie eine violette Farbe an, analog der Pflanzencellulose; eine weitere Uebereinstimmung mit der Letzteren fand Schäfer in der Löslichkeit in Kupferoxydammoniak und Fällbarkeit dieser Lösung durch Salzsäure; er stellte ferner fest, dass durch concentrirte Salpetersäure oder ein Gemisch dieser mit concentrirter Schwefelsäure ein Nitrirungsprodukt entsteht; dasselbe verpuffte beim Anzünden wie Schiessbaumwolle und löste sich in einem Gemisch von Alkohol und Aether, beim Verdunsten dieser Lösung hinterblieb eine dünne, durchsichtige Haut. So ergeben sich aus den Untersuchungen Schäfer's verschiedene Punkte, in denen das Tunicin mit der Pflanzencellulose übereinstimmt.

Eine Arbeit neueren Datums über die Mäntel der Tunicaten liegt von R. Schütze[1]) vor. Nach seinen Untersuchungen enthalten die Mäntel neben stickstoffhaltigen Substanzen und Cellulose noch Cholesterin, Fett, freie Oel- Valerian-, Palmitin- und Stearinsäuren. Die Asche der Mäntel enthält 2.76 % Kieselsäure; 12.72 % Phosphorsäure; 15,81 % Eisenoxyd; 9,52 Thonerde; 3.91 % Calciumphosphat, 49.22 % Calciumcarbonat und 0,3 % Magnesiumcarbonat. Die Reingewinnung der Cellulose gelang ihm durch Digeriren der Mäntel mit 20 proc. Kalilauge, darauffolgender Behandlung mit 10 proc. Salzsäure und Fluorwasserstoffsäure. Diese Cellulose hatte folgende Zusammensetzung: C 43,47 % H 6,25 %.

Was nun das Vorkommen der Cellulose im Thierreich betrifft, so beschränkt sich dasselbe nicht auf die Gruppe der Tunicaten, sondern ist nach den neuesten Untersuchungen, die von H. Ambronn[2]) an der zoologischen Station zu

---

[1]) Jahresbericht über die Fortschritte der Thierchemie, Bd. 19, S. 328; Mittheilung d. pharm. Inst. Erlangen, 2. Heft, S. 280—281.

[2]) Mittheilung aus der zoologischen Station zu Neapel, 9, 475—478. Jahresbericht über die Fortschritte der Thierchemie, Bd. 20, S. 318.

Neapel ausgeführt worden weiter verbreitet; sie ist, wenn auch nicht isolirt, so doch durch qualitative Reactionen bei folgenden Thieren nachgewiesen worden: bei den Copepoden, Spinnen, Heuschrecken, Bienen und Myriapoden, weiter wurde die Cellulosereaktion an den Panzertheilen und besonders schön an den Sehnen der grösseren Crustaceen: Eupagurus, Squilla, Homarus, Munida, Scyllarus, ferner an der Schulpe von Sepia und Loligo, auch bei einigen Muscheln und Schnecken beobachtet. Aus der Rückenschulpe der Cephalopoden liess sich, nach Entfernen des Kalkes, mit Kupferoxydammoniak ein Theil derselben ausziehen. Diese Lösung gab mit Salzsäure einen weissen, faserigen Niederschlag, der die Violettfärbung sehr stark zeigte und wohl thierische Cellulose war.

Erwähnt sei noch, dass nach den Versuchen von Krukenberg[1]) Tunicin weder von Pepsin, Trypsin, noch menschlichem Speichel angegriffen wird.

Da nun die Thiercellulose der pflanzlichen in ihren Eigenschaften so nahe steht, war es noch von Interesse zu erforschen, ob die Thiercellulose bei der Hydrolyse auch Traubenzucker liefert, wie dies schon früher für die Baumwollcellulose nachgewiesen und nach den neuesten Untersuchungen von E. Schulze[2]) auch für eine grosse Anzahl anderer pflanzlichen Cellulosen verschiedener Herkunft gilt. Versuche zur Lösung dieser Frage sind von Berthelot (l. c.), Schäfer (l. c.), Franchimont (l. c.) und R. Schütze (l. c.) angestellt worden. Berthelot verrieb das Tunicin mit concentrirter Schwefelsäure, worin es sich allmählig löste, diese Lösung wurde nun tropfenweise in ein grösseres Quantum siedenden Wassers gegossen, die Flüssigkeit nach einiger Zeit mit Kreide neutralisirt und das Filtrat zum Syrup eingedunstet, er erhielt so ein Gemisch von Zucker und einer unbekannten Substanz. Dieser Zuckersyrup reducirte energisch die Fehling'sche Lösung und gab mit Hefe angerührt Kohlensäure und Alkohol,

[1]) Vergleichend — physiologische Studien, I. Reihe 5, S. 32, Anmerkung. Krukenberg (vgl. phys. Vorträge, III. Reihe, S. 196—198) gibt auch eine Zusammenstellung der einschlägigen Litteratur.

[2]) Diese Zeitschrift, Bd. 16, S. 387—436; Ber. XXIV, 277.

welch letzterer rein dargestellt wurde. Schäfer (l. c.) hat versucht durch Kochen des Tunicins mit verdünnter Schwefelsäure Zucker zu erhalten, da er aber auf diesem Wege kein positives Resultat gewinnen konnte, versuchte er die Hydrolyse des Tunicins mit verdünnter Schwefelsäure unter Druck, konnte aber nur constatiren, dass die erhaltene Flüssigkeit die Fehling'sche Lösung reducirte. Zu einem günstigeren, obgleich nicht abschliessenden Resultat gelangte Franchimont[1]). Derselbe stellte das zu seiner Untersuchung nöthige Tunicin in der gewöhnlichen Weise durch Behandeln der Mäntel mit Säuren, Alkalien, Wasser und Alkohol dar; das resultirende Product wurde in Kupferoxydammoniak gelöst, die Lösung mit Salzsäure gefällt und der Niederschlag gut ausgewaschen, letzterer wurde nun mit concentrirter Schwefelsäure verrieben, das Gemisch 24 Stunden stehen gelassen, die mit viel Wasser verdünnte Flüssigkeit zeigte bedeutende Rechtsdrehung, dieselbe wurde 48 Stunden am Rückflusskühler gekocht, darauf mit Baryumcarbonat neutralisirt und das Filtrat eingedampft. Aus dem Syrup schieden sich nach 3 Tagen Krystalle aus, die das Aussehen der gewöhnlichen «Glucose» besassen. Die wässerige Lösung dieser Krystalle zeigte starke Rechtsdrehung und Birotation. Auf Grund dieser Eigenschaften vermuthete Franchimont, dass sein Zucker Traubenzucker war. R. Schütze[2]) erhielt durch Kochen mit 10proc. Schwefelsäure unter Druck eine die Fehling'sche Lösung reducirende Flüssigkeit, die mit Hefe versetzt Kohlensäure entwickelte. Diese Versuche bringen aber noch keinen endgültigen Beweis dafür, dass der entstandene Zucker Traubenzucker war, denn abgesehen davon, dass verschiedene Zuckerarten Birotation zeigen und mit Hefe vergähren, wäre es ja auch möglich, dass ein unbekannter Zucker entstanden wäre, da nun Franchimont auch keines der charakteristischen Umwandlungsproducte und keine Derivate seines Zuckers dargestellt hat, so ist die Frage nach der Natur der bei Hydrolyse des Tunicin entstehenden Zuckerart noch als eine offene

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 12, S. 1938.

[2]) Loc. cit.

zu bezeichnen. Ich habe daher auf Veranlassung von Prof. E. Schulze die Thiercellulose einer erneuten Untersuchung unterzogen. Das hierzu nöthige Material, bestehend in trockenen Ascidienmänteln[1]), erhielt ich durch Gefälligkeit der zoologischen Station zu Neapel. Die Mäntel wurden behufs Entfernung der anhaftenden Salze mehrere Tage in kaltem Wasser eingeweicht, dann einige Stunden mit Wasser gekocht und zuletzt einen Tag mit sehr verdünnter Salzsäure digerirt, bei dieser Behandlung waren die meisten Mäntel weich und durchscheinend geworden. Sie enthielten noch 1,30 % Asche und gaben bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 4,02 % N, wie nachstehende Zahlen beweisen:

a) 1 gr. Substanz gab 0,00391 gr. N = 7 cbcm. Lauge (1 cbcm. Lauge = 0,005593 gr. N).

b) 1 gr. Substanz gab 0,0414 gr. N = 7,4 cbcm. Lauge (1 cbcm. Lauge = 0,005593 gr. N).

Bei den ersten Versuchen, die ich zur Gewinnung des Tunicins anstellte, verfuhr ich im wesentlichen nach den Angaben Berthelots (l. c.), ich erhielt aber dabei nur eine so geringe Ausbeute[2]) an stickstofffreier Substanz, dass die Annahme, es sei durch die angewendeten starken Reagentien ein Theil des Tunicins zerstört worden, als eine berechtigte erscheint. Ich suchte daher zunächst festzustellen, ob man nicht durch viel schwächere Agentien die beigemengten stickstoffhaltigen Substanzen u. s. w. entfernen und die Cellulose rein erhalten kann. Ueber die Details dieser Versuche ist folgendes anzugeben: Die in beschriebener Weise präparirten Mäntel wurden, um sie pulverisiren zu können, mehrere Stunden lang bei 110° getrocknet, dann im Mörser zerstossen und schliesslich auf einer Mühle fein gemahlen.

2 gr. dieses Pulvers wurden 1 Stunde mit 1proc. Kalilauge gekocht, nach Beendigung des Kochens die Flüssigkeit

[1]) Es kamen hauptsächlich die Mäntel von Ascidia mentula und Ascidia mammillaris zur Verwendung.

[2]) Ich erhielt aus 100 gr. nur 4 gr. Tunicin, während doch nach Löwig und Kölliker ungefähr $^2/_3$ der Mäntel aus stickstofffreier Substanz bestehen soll.

vom Rückstand abgehebert, noch einige Male durch Decantation ausgewaschen, dann wurde der Rückstand auf ein getrocknetes und gewogenes Filter gebracht, mit Wasser vollständig ausgewaschen und zuletzt mit Alkohol und Aether übergossen. Ich erhielt hierbei 0,9940 gr., bei einem zweiten Versuche 1,000 gr. Rückstand; aus diesen Zahlen berechnet sich im Mittel ein Verlust von 47,91 %. Der erhaltene Rückstand gab bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl folgende Resultate:

Je 1 gr. Substanz gaben 0,00167 gr. N = 0,3 cbcm. Lauge (1 cbcm. Lauge = 0,00593 gr. N), bezw. 0,001186 gr. N = 0,2 cbcm. der gleichen Lauge. Daraus berechnet sich im Mittel ein Gehalt von 0,13 % Stickstoff.

Als ich die 1proc. Lauge durch 5proc. ersetzte, im Uebrigen aber wie oben verfuhr, betrug der Verlust 50,91 %, wie aus folgenden Zahlen ersichtlich: 1,915 gr. Trockensubstanz gaben 0,9774 gr. Rückstand. Der Stickstoffgehalt dieses Rückstandes war derselbe geblieben. Weiter suchte ich nun das Verhalten der Mäntel gegen verdünnte Säuren festzustellen, dieses geschah wie folgt: Die in angegebener Weise gereinigten und zerkleinerten Mäntel wurden 1 Stunde mit 1¼ proc. Schwefelsäure am Rückflusskühler gekocht, der dabei verbleibende Rückstand auf ein getrocknetes und gewogenes Filter gebracht, die Säure vollständig ausgewaschen und darauf mit Alkohol und Aether behandelt, wieder getrocknet und gewogen. Ich erhielt folgende Resultate:

Je 1 gr. gemahlener Mäntel gaben in 2 Versuchen 0,6400 gr. bezw. 0,6420 gr. Rückstand, daraus berechnet sich ein Verlust von 35,9 %.

Dieser Rückstand gab bei der Stickstoffbestimmung folgende Zahlen:

Je 1 gr. Substanz gaben 0,0100 gr. N = 1,8 cbcm. (1 cbcm. Lauge = 0,00593 gr. N), bezw. 0,0110 gr. N = 1,98 cbcm. der gleichen Lauge. Daraus berechnet sich im Mittel ein Gehalt von 1,05 % Stickstoff.

Die beim Kochen mit verdünnter Säure entstandene Flüssigkeit enthielt eine die Fehling'sche Lösung reducirende Glucose; die Menge derselben wurde folgendermassen bestimmt; Das Filtrat und die ersten Antheile des Waschwassers wurden, behufs Entfernung der stickstoffhaltigen Körper, mit Bleiessig

ausgefällt, im Filtrat das Blei durch Schwefelsäure entfernt und in der vom Bleisulfat getrennten Flüssigkeit die Zuckermenge nach Allihn bestimmt. Ich erhielt folgende Zahlen:

a) 0,1310 gr. Cu = 0,0667 gr. Dextrose,
b) 0,1330 gr. Cu = 0,0677 gr. Dextrose,

im Mittel also 6,72 % Glucose berechnet als Dextrose.

Ob dieser Zucker durch Umwandlung des Tunicins entstanden war, scheint zunächst fraglich, es liegt im Bereich der Möglichkeit, dass die Ascidienmäntel neben Tunicin ein gegen Säuren weniger widerstandsfähiges Kohlenhydrat enthalten.

Nach diesen Versuchsergebnissen erschien es unnöthig, stärkere Kalilauge als 1procentige anzuwenden, weiter schien es auch angezeigt, nach dem Kochen mit Lauge eine Behandlung mit stark verdünnter Säure folgen zu lassen, um nicht nur die Salze, sondern auch die etwaig vorhandenen leichter löslichen Kohlenhydrate zu entfernen. Demgemäss verfuhr ich wie folgt: Die fein pulverisirten Mäntel wurden 1 Stunde mit 1procentiger Kalilauge gekocht, der Rückstand bis zum Verschwinden der alkalischen Reaction ausgewaschen und Letzterer noch 1 Stunde mit 2procentiger Schwefelsäure gekocht, die Säure durch Auswaschen mit destillirtem Wasser entfernt und der Rückstand zuletzt mit Alkohol und Aether behandelt. Ich erhielt dabei das Tunicin als eine weisse, beinah aschenfreie Substanz, welche alle für Pflanzencellulose geltenden Reactionen gab. Sie war löslich im Kupferoxydammoniak, wurde aus dieser Lösung durch Salzsäure ausgefällt, löste sich nicht in verdünnten Säuren und Alkalien, gab mit Jod und Schwefelsäure ebenso wie mit Chlorzink und Jod Blaufärbung, ferner löste sich die ganz fein zerriebene Cellulose, wenn auch sehr langsam, so doch beinah vollständig in dem von Cross und Bevan angegebenen Gemisch von Zinkchlorid und Salzsäure. Sie zeigte ferner auch die für Pflanzencellulose charakteristische Widerstandsfähigkeit gegen Oxydationsgemisch. Als ich 1 gr. der gemahlenen Mäntel mit Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,06 zu einem Brei anrührte und soviel Kaliumchlorat hinzufügte, dass noch ein Theil des Letzteren ungelöst blieb, dann 24 Stunden

stehen liess, darauf mit Wasser vollständig auswusch und den Rückstand mit verdünntem Ammoniak eine Stunde lang bei 60° digerirte, resultirten nach dem Auswaschen des Ammoniaks 0,4600 gr. eines farblosen Rückstandes. Ungefähr die gleiche Menge hinterbleibt, wenn man die Mäntel mit 1 proc. Kalilauge und 2proc. Schwefelsäure behandelt, wie dies oben angegeben.

Da nun Berthelot der Thiercellulose eine grössere Widerstandsfähigkeit gegen Säuren zuschreibt, als der Pflanzencellulose, habe ich über diese Frage noch einige Versuche angestellt. Dies geschah wie folgt: Abgewogene Substanzmengen, deren Wassergehalt durch Trocknen bei 105° ermittelt worden war, kochte ich 1 Stunde mit 1¼procentiger, bzw. 5procentiger Schwefelsäure, brachte die Rückstände auf getrocknete und gewogene Filter, wusch auf den Filtern bis zum Verschwinden der sauren Reaction aus und übergoss die Filterinhalte zuletzt noch mit Alkohol und darauf mit Aether, trocknete bis zum constanten Gewicht und wog wieder. So ergab sich der beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure entstehende Gewichtsverlust. Ich habe aber auch noch die dabei gebildete Glucosemenge bestimmt. Zu diesem Zwecke wurden die Filtrate von den Rückständen nebst den ersten Antheilen der Waschwässer soweit eingedampft, dass die Flüssigkeiten etwa 2% Schwefelsäure enthielten, dann wurde zur vollständigen Inversion noch 2 Stunden gekocht und die Zuckermenge, nach vorangegangener Neutralisation, nach der Allihn'schen Methode ermittelt.

Ich erhielt folgende Resultate:

a) 0,8462 gr. aschenfreie Trockensubstanz gaben nach einstündigem Kochen mit 200 cbcm. 1¼ procentiger Schwefelsäure 0,8160 gr. Rückstand; daraus berechnet sich ein Verlust von 3,58 %.

Die Dextrosemenge betrug 2,82 %, wie aus nachstehenden Zahlen ersichtlich: 0,0460 gr. Cu = 0,0239 gr. Dextrose.

b) 1 gr. aschenfreie Trockensnbstanz gaben nach 1stündigem Kochen mit 200 cbcm. 5procentiger Schwefelsäure 0,943 gr. Rückstand; der Verlust betrug also 5,70 %.

Die Dextrosemenge ergab sich aus nachstehenden Zahlen zu 4,12 %: 0,0808 gr. Cu = 0,0412 gr. Dextrose. Aus diesen Versuchen geht also hervor, dass die Widerstandsfähigkeit der

Thiercellulose gegen $1\frac{1}{4}$proc. und 5proc. Schwefelsäure keine grössere ist, als ich sie für eine Anzahl verschiedener Pflanzencellulosen[1]) gefunden habe. Ich habe also in dieser Hinsicht keinen Unterschied von der Pflanzencellulose finden können.

Wie schon früher erwähnt worden ist, musste ich es als eine Hauptaufgabe betrachten, über die Beschaffenheit des bei Hydrolyse der Thiercellulose entstehenden Zuckers Aufschluss zu gewinnen. Für die bezüglichen Versuche verwendete ich Tunicin, welches in der oben beschriebenen Weise aus den Ascidienmänteln hergestellt war. 30 gr. des fein zerriebenen Materials wurden in 180 gr. eines Gemisches von 100 Theilen 98proc. Schwefelsäure und 30 gr. Wasser allmählich eingetragen, die Masse öfters durchgerührt, bis sich der anfänglich dicke Brei verflüssigt hatte, nun liess ich über Nacht stehen, verdünnte die Lösung mit soviel Wasser, dass sie circa $2\frac{1}{2}$ % Schwefelsäure enthielt, kochte die Flüssigkeit 3 Stunden am Rückflusskühler, die noch warme Flüssigkeit wurde mit pulverisirtem Barythydrat versetzt und vom ausgeschiedenen Baryumsulfat abfiltrirt. Die farblose, schwach saure Lösung dunstete ich vorsichtig zum Syrup ein, letzteren extrahirte ich wiederholt mit heissem Alkohol; die weingeistige Lösung wurde im Exsiccator der Verdunstung überlassen. Nach mehreren Tagen hatten sich warzenförmige Krystalle ausgeschieden; dieselben wurden zwischen Leinwand stark abgepresst, der Rückstand wiederholt aus 95proc. Weingeist und zuletzt 2mal aus Methylalkohol umkrystallisirt. Bei der Ermittlung des specifischen Drehungsvermögens für das so gewonnene Product wurde folgendes Resultat erhalten: Eine wässerige Lösung, welche in 10 cbcm. 0,9860 gr. enthielt, drehte nach 24stündigem Stehen im 200 mm.-Rohr im Soleil Ventzke'schen Apparat 30° nach rechts; daraus berechnet sich $[\alpha]_D = + 52{,}64$ %. Diese Zahl stimmt mit dem für Dextrose gefundenen überein; nach Tollens[3]) ist $[\alpha]_D$ für eine 10proc. Traubenzuckerlösung $= + 52{,}74$[2]).

[1]) Landwirthschaftliche Versuchsstation, Bd. XLI, S. 375—389.

[2]) Die Drehung betrug gleich nach der Auflösung 48°; der Zucker zeigte also Birotation.

[3]) Handbuch der Kohlenhydrate, S. 45.

Bei der Polarisation von zwei anderen Krystallisationen, welche nicht aus Methylalkohol umkrystallisirt waren und welche den grössten Theil des bei Hydrolyse des Tunicins gewonnenen Zuckers ausmachten, erhielt ich folgende Zahlen:

I. Eine wässerige Lösung, welche in 10 cbcm. 0,933 gr. Substanz enthielt, drehte im 200-mm-Rohr $+24^0$. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D = +45{,}04^0$.

II. Eine wässerige Lösung, welche in 10 cbcm. 1,0285 gr. Substanz enthielt, drehte im 20-mm-Rohr $+26{,}9^0$. Daraus berechnet sich $[\alpha]_D = +45{,}25^0$.

Diese beiden etwa zehnmal aus Weingeist umkrystallisirten Zuckerpräparate gaben also bei der Untersuchung im Polarisationsapparat Zahlen, welche nicht genau auf Dextrose stimmten und erst nach zweimaligem Umkrystallisiren aus Methylalkohol konnte ein völlig reines Dextrosepräparat gewonnen werden, was darauf hindeutet, dass demselben anfänglich eine andere Zuckerart beigemengt war.

Bei der Oxydation des völlig gereinigten Zuckers mit Salpetersäure vom specif. Gew. 1,15 nach den Vorschriften von Gans und Tollens[1]) entstand Zuckersäure; dieselbe wurde in das saure Kaliumsalz übergeführt und aus letzterem das Silbersalz dargestellt. Die Analyse desselben gab folgendes Resultat:

0,527 gr. zuckersaures Silber gaben 0,268 gr. Ag. Daraus berechnet sich ein Gehalt von 50,88 % Ag. Die theoretische Menge beträgt 50.94 % Ag.

Ich erhielt aus 1,5 gr. Zucker 0,527 gr. zuckersaures Silber, eine Ausbeute, welche der von Gans und Tollens aus reiner Dextrose erhaltenen ungefähr entspricht.

Ich oxydirte nun noch zwei andere Krystallisationen und konnte in beiden Fällen zuckersaures Silber gewinnen. Die Analyse der Silbersalze ergab folgende Zahlen:

I. 0,2866 gr. zuckersaures Silber gaben 0,1455 gr. Ag. Daraus berechnet sich ein Gehalt von 50,76 % Ag.

II. 0,2560 gr. zuckersaures Silber gaben 0,1300 gr. Ag. Daraus berechnet sich ein Gehalt von 50,78 % Ag.

---

[1]) Ann. d. Chem. u. Pharm., 249, S. 218.

Es sei noch bemerkt, dass bei der Oxydation dieser Krystallfractionen weniger zuckersaures Silber erhalten wurde und zwar nur circa 70 % bzw. 60 %, der von Gans und Tollens aus Dextrose erhaltenen Quantität. Auch dieses deutet darauf hin, dass der Dextrose noch eine andere Substanz beigemengt war.

Ich prüfte nun ferner noch das Verhalten des völlig gereinigten Zuckers gegen Hefe und zwar nach der von Stone und Tollens[1]) gegebenen Vorschrift. 0,2 gr. Zucker gaben 47 cbcm. Gas, während aus der gleichen Menge Traubenzucker 50 cbcm. erhalten wurden.

Schliesslich wurde noch das Osazon durch Erhitzen der wässerigen Zuckerlösung mit der angemessenen Menge essigsauren Phenylhydrazins dargestellt; das ausgeschiedene gelbe Product nach dem Abfiltriren aus kochendem 80proc. Weingeist umkrystallisirt. Dasselbe schmolz bei raschem Erhitzen bei 203°.

Die im Vorigen mitgetheilten Versuchsergebnisse machen es zweifellos, dass bei der Hydrolyse des Tunicins Traubenzucker entstanden war. Dass aber die Krystalle anfangs noch eine geringe Menge eines anderen Zuckers einschlossen, geht aus dem im Vorigen mitgetheilten hervor; dafür spricht ferner auch noch die Thatsache, dass ein Zuckerpräparat, dessen specif. Drehung + 45,25° war, bei dem Gährversuch nur 37 cbcm. Gas lieferte. Dieser Zucker war aber weder Galactose, noch Mannose, noch eine Pentose. Denn bei der Oxydation des Zuckers entstand keine Schleimsäure, die wässerige Lösung des Zuckers gab mit essigsaurem Phenylhydrazin in der Kälte keine Fällung und beim Kochen des Tunicins mit 12proc. Salzsäure liess sich kein Furfurol nachweisen.

Ueberblickt man die bei der Untersuchung des Tunicin bis jetzt gewonnenen Resultate, so muss man zur Ueberzeugung kommen, dass dasselbe eine der Pflanzencellulose in chemischer Hinsicht sehr nahe verwandte und vielleicht sogar

---

[1]) Ann. d. Chem. u. Pharm. 249, S. 259.

mit derselben identische Substanz ist. Denn dasselbe besitzt eine Elementarzusammensetzung, welche sich durch die Formel $C_6H_{10}O_5$ ausdrücken lässt; es wird durch Jod und Schwefelsäure oder Chlorzink und Jod blau oder blauviolett gefärbt; es löst sich in Kupferoxydammoniak, sowie in einem Gemisch von Zinkchlorid und Salzsäure; es ist unlöslich in verdünnten Säuren und Alkalien; es wird durch ein Gemisch von Kaliumchlorat und Salzsäure und darauffolgende Behandlung mit warmem verdünnten Ammoniak nicht aufgelöst; es gibt bei der Behandlung mit einem Gemisch von concentrirter Schwefelsäure und Salpetersäure ein Nitroproduct, welches der Nitrocellulose gleicht; endlich liefert es bei der Hydrolyse Traubenzucker. In allen diesen Punkten stimmt es also mit der Pflanzencellulose überein. Dass die Thiercellulose, wie Berthelot behauptet, eine grössere Resistenzfähigkeit gegen Säuren als die Pflanzencellulose besitzt, habe ich nicht beobachten können.

Dass sich neben Traubenzucker noch eine geringere Menge eines anderen Zuckers gebildet hat, steht mit der von mir entwickelten Ansicht nicht im Widerspruch, denn nach den Untersuchungen von E. Schulze[1]) gilt das Gleiche für manche Präparate von Pflanzencellulose.

Ich kann endlich noch mittheilen, dass nach Versuchen, welche Herr Prof. C. Cramer auszuführen die Güte hatte, die Substanz der Tunicatenmäntel, gleich den pflanzlichen Zellwandungen, unter dem Polarisationsmikroskop sehr schön die Erscheinung der Doppelbrechung zeigt[2]).

---

[1]) Diese Zeitschrift, Bd. 16, S. 427—429.

[2]) Vergleiche auch die Arbeit von H. Ambronn (Mitthlg. der zoolog. Station zu Neapel, Bd. 9, S. 475).

Einige Bemerkungen über phosphorhaltige Blutfarbstoffe.

Von

Dr. med. Y. Inoko.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 19. März 1893.)

Hoppe-Seyler[1]) zeigte bei seinen Untersuchungen über die Blutfarbstoffe, dass die Oxyhämoglobinkrystalle der Gans sich durch ihren Phosphorgehalt von den gleichen Krystallen anderer Blutarten unterscheiden. Derselbe Forscher wies bereits darauf hin[2]), dass in diesem Falle das in den rothen Blutkörperchen vorhandene Nuclein in ursächlichem Zusammenhang mit dem Phosphorgehalt stehe, da die kernlosen Blutkörperchen auch phosphorfreie Oxyhämoglobinkrystalle liefern. Zu einem ähnlichen Resultate führten auch die Analysen der Krystalle des Hühnerblutes von Jaquet[3]). Hoppe-Seyler erhielt in 3 Analysen 0,375—0,323—0,306 % P, Jaquet fand 0,197 % P im Oxyhämoglobin des Hühnerblutes. Wenn das Nuclein oder die Nucleinsäure in den Krystallen des Oxyhämoglobins enthalten ist, so liegt hier eine Verbindung vor, welche sehr interessant erscheinen muss. Bekanntlich betrachtet man die Nucleine als Verbindungen von Nucleinsäuren mit Eiweiss. Wenn es gelingt, eine solche Verbindung in kristallisirtem Zustande zu gewinnen, so ist dadurch die Möglichkeit gegeben, diese wichtigen Verbindungen genau zu charakterisiren. Ich

---

1) Medic.-chem. Untersuchungen, S. 169.

2) Handbuch d. physiol. u. pathol.-chem. Analyse, 5. Aufl., S. 292, Anmerkung.

3) Diese Zeitschrift, Bd. 14, S. 289.

habe es daher auf Veranlassung von Herrn Prof. A. Kossel unternommen, die Frage zu entscheiden, ob die Vogelblutkrystalle Nucleinsäure enthalten und ob man durch Zusatz von Nucleinsäure zu Oxyhämoglobin eines Säugethieres eine analoge krystallisirende Verbindung erhalten kann.

I.

Da die Darstellung der Nucleinsäure als solcher bei den relativ geringen Mengen des zu Gebote stehenden Materials kaum möglich erschien, versuchte ich den Nachweis der Nucleinbasen, welche nach A. Kossel Zersetzungsproducte der Nucleinsäuren sind, zu führen.

Zu diesem Zwecke wurden 15 gr. Gänsebluthämoglobin, welche zweimal umkrystallisirt waren, gepulvert, in 150 cbcm. 1proc. Schwefelsäure suspendirt und auf dem Wasserbade drei Stunden lang gekocht, dann noch einmal 150 cbcm. 1proc. Schwefelsäure hinzugefügt und die Mischung direct über Drahtnetz erhitzt und zwar eine Stunde. Darauf mit Baryt stark alkalisch gemacht, auf dem Wasserbade eine Stunde erwärmt, Kohlensäure bis zur Uebersättigung durchgeleitet, alsdann filtrirt. Das Filtrat wurde durch verdünnte Schwefelsäure vom Baryt befreit und nach Neutralisation mit Ammoniak auf dem Wasserbade eingeengt bis auf etwa ein Viertel. Eine kleine Probe wurde mit ammoniakalischer Silberlösung behandelt, ohne dass jedoch irgend eine Fällung auftrat. Die weitere Untersuchung zeigte, dass eine beträchtliche Menge Pepton zugegen war, welches bekanntlich die Bildung des Silberniederschlages zu verhindern vermag. Um dasselbe zu entfernen, wurde die Flüssigkeit auf dem Wasserbade stark concentrirt, der Rückstand mit absolutem Alkohol versetzt und filtrirt. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade vom Alkohol befreit, die restirende Masse mit Wasser aufgenommen, worin sie sich nicht völlig klar auflöste, und filtrirt. Das Filtrat gab nun mit ammoniakalischer Silberlösung zwar sehr spärliche, aber immerhin deutlich flockige, weisse Fällung. Dieselbe wurde durch ein ganz kleines Filter abfiltrirt, mit Salpetersäure von 1,1 specif. Gewicht unter Zusatz von etwas

Harnstoff erwärmt und heiss filtrirt auf ein Uhrglas. Beim Erkalten entstand eine Fällung, die nach nochmaligem Lösen und Abscheiden eine krystallinische Beschaffenheit erlangte. Es gelang auf diese Weise, kleine gelbe Körnchen zu erhalten, die schon bei schwacher Vergrösserung als farblose Prismen ersichtlich waren, welche sich als doppelbrechend erwiesen. Diese Krystallconglomerate wurden zuerst durch Behandlung mit Ammoniakflüssigkeit von Salpetersäure befreit, mit etwas Wasser und einem Tropfen Salzsäure versetzt, über der Flamme vorsichtig erwärmt, durch einen Papierstreifen filtrirt und das Filtrat auf zwei Objectgläser vertheilt. Das eine wurde mit einem Deckglas bedeckt einfach hingestellt; das andere mit einem Tropfen Salzsäure und Goldchlorid versetzt und ebenfalls der Krystallisation überlassen. Nach einiger Zeit entstanden auf dem ersteren mikroskopische Krystalle, unter denen wir die dem salzsauren Adenin eigenthümliehen Primen sehr deutlich sehen konnten. Auf dem andern Objectglas krystallisirte alsbald das Golddoppelsalz von Adenin in prächtigen gelben mikroskopischen Krystallen von prismatischer Gestalt.

Somit ist das Vorkommen des Aldenins unter den Zersetzungsproducten des Gänsebluthämoglobin sicher nachgewiesen und hierdurch gewinnt die Ansicht, dass der Phosphorgehalt auf Nuclein oder Nucleinsäure zu beziehen sei, eine weitere Stütze.

II.

Die für die folgenden Versuche benutzte Nucleinsäure wurde nach einem mir von Prof. Kossel angegebenen, später zu publicirenden Verfahren aus Kalbsthymus dargestellt. Es standen mir 0,7 gr. völlig reine Substanz zu Gebote. Das Oxyhämoglobin erhielt ich nach der üblichen Methode aus Pferdeblut.

Es zeigte sich schon bei den ersten Versuchen, dass die Oxyhämoglobinlösung durch Zusatz von Nucleinsäure in Form eines klebrigen Niederschlages gefällt wird, ohne dass die optischen Eigenschaften eine Aenderung erfahren; auch nach einiger Zeit zeigten dieselben das reine Spectrum des Oxy-

hämoglobins. Es war bisher ausser dem Alkohol nur ein Fällungsmittel bekannt, welches das Oxyhämoglobin aus den Lösungen ohne tiefgreifende Veränderung niederschlägt, nämlich das bis zur Sättigung eingetragene Kaliumcarbonat. Beide Fällungsmittel können aber bekanntlich nur unter ganz besonderen Cautelen angewandt werden, ohne den Farbstoff zu verändern. Das Oxyhämoglobin bildet noch eine zweite Verbindung mit Nucleinsäure, welche in Wasser löslich ist und krystallisirt, und diese letztere habe ich in folgender Weise gewonnen.

Ich löste 10 gr. feuchtes Oxyhämoglobin in 100 cbcm. 5 promill. Nucleinsäurelösung (Nucleinsäure = 0,5 gr.) bei 40° C., filtrirte rasch, liess auf 0° abkühlen, fügte dazu 25 cbcm. absoluten Alkohol, der ebenfalls auf 0° abgekühlt war, und liess einen Tag unter 0° stehen. Es bildeten sich feine Krystalle, die sich bei mikroskopischer Betrachtung in der Form von Prismen zeigten. Die Krystalle filtrirte ich ab, löste sie bei 40° in Wasser, filtrirte, liess das Filtrat abkühlen, versetzte mit abgekühltem Alkohol und setzte der Kälte aus. Die ausgeschiedenen Krystalle wurden abfiltrirt, zwischen Fliesspapier abgepresst und im Exsiccator getrocknet. Sie waren phosphorhaltig. Eine Phosphorbestimmung nach der Molybdänmethode ergab folgendes:

1,1491 gr. auf 105°—110° C. bis zur Gewichtsconstanz getrockneten Krystallpulvers lieferten 0,017 $Mg_2 P_2 O_7$ = 0,00475 P = 0,413 % P.

Somit ergibt sich, dass bei Zusatz einer Nucleinsäurelösung zu dem Oxyhämoglobin des Pferdeblutes Krystalle erhalten werden, welche bezüglich ihres Phosphorgehaltes denen des Gänseblutes entsprechen.

Diese Versuche werden im hiesigen Laboratorium fortgesetzt werden.

Zum Schluss erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. A. Kossel für seine liebenswürdige Unterstützung meinen wärmsten Dank abzustatten. Ebenso danke ich seinem Assistenten Herrn Dr. Krüger.

Berlin, im März 1893.

Untersuchung der Proteïnsubstanzen in den leichtbrechenden Medien des Auges I.

Von

Carl Th. Mörner in Upsala.

(Der Redaction zugegangen am 10. April 1893).

Da unsere Kenntniss über die Proteïnsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges sehr unvollständig ist, habe ich sie zum Gegenstande näherer Untersuchung gemacht, und beabsichtige hier über die erhaltenen Resultate zu berichten.

Die lichtbrechenden Medien umfassen, wie bekannt, mehrere anatomisch deutlich getrennte Schichten, welche, ununterbrochen auf einander gelagert, ein vollendetes Linsensystem bilden, nämlich von aussen nach innen gerechnet: eine feste, membranöse Bildung, die Hornhaut (cornea), eine wasserklare Flüssigkeit, das Kammerwasser (humor aqueus), die relativ feste, biconvex geformte, in eine papierdünne, homogene Membran, die Linsenkapsel (capsula lentis), eingeschlossene Linse (lens crystallina), und der seiner Consistenz nach geléeartige, halbflüssige Glaskörper (corpus vitreum).

Auch ist es ganz natürlich, dass eine chemische Untersuchung der lichtbrechenden Medien, wenn sie zu einem Resultat führen soll, in wenigstens ebenso viele Unterabtheilungen zerfallen muss. In Uebereinstimmung damit wird in dieser Abhandlung jedem einzelnen der genannten anatomisch begrenzbaren Schichten ein besonderes Kapitel gewidmet.

Ehe wir zu diesen besonderen Abtheilungen übergehen, möge es mir gestattet sein, zur Vermeidung unnöthiger Wiederholungen, an einem Orte die nothwendigsten Erklärungen über die Art des Untersuchungsmaterials und die Beschaffenheit der angewandten Arbeitsmethoden zusammenzustellen.

Untersuchungsmaterial.

Eine unentbehrliche Voraussetzung für eine zufriedenstellende Lösung der Frage über die chemischen Verhältnisse der lichtbrechenden Medien besteht in der Möglichkeit, genau und sicher die verschiedenen Schichten so von einander trennen zu können, dass jede für sich allein, frei von fremder Beimengung, zur Untersuchung gelangen kann. Wenn die Erfüllung dieser Bedingung auch in gewissen Fällen mit bedeutender Mühe und Zeitaufwand (z. B. beim Präpariren der Linsenkapsel) verknüpft ist, *so lässt sie sich doch unter allen Umständen erreichen,* vorausgesetzt, dass beim Präpariren ein genaues und methodisches Verfahren eingehalten wird.

Alles bei dieser Arbeit angewandte Untersuchungsmaterial[1]), welches ausschliesslich von Rindvieh, und, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben, immer von ausgewachsenen Thieren genommen wurde, holte ich beständig, Tag für Tag, persönlich vom Markte ab, wodurch ich Gewissheit über den Ursprung und den frischen Zustand des Materials gewann. An Ort und Stelle nahm ich die erste grobe Präparation vor. Unmittelbar nach meiner Ankunft im Laboratorium setzte ich die Loslösung der verschiedenen Theile fort, und ergriff Massregeln zu deren provisorischer Conservirung.

Arbeitsmethoden.

1. Bestimmung der Coagulationstemperatur für Eiweisskörper.

Um bei denselben Eiweisskörpern einen constanten Werth für die Coagulationstemperatur, und bei verschiedenen Eiweisskörpern mit einander vergleichbare Werthe zu erhalten, ist

[1]) Aus mehr als 2000 Stück Augen bestehend.

es nothwendig, bei verschiedenen Gelegenheiten unter womöglich gleichen Umständen zu arbeiten.

Unter solchen Verhältnissen erscheint es mir nicht ungeeignet, das von mir bei *allen* hierher gehörigen Bestimmungen consequent eingeschlagene Verfahren näher zu präcisiren.

Für eine langsam und beständig steigende Erwärmung sorgte ich dadurch, dass die Probenröhre, sowie der Thermometer, an einer Korkplatte befestigt, in einem mit Wasser gefüllten grossen Glasgefäss (von 2—3 L. Inhalt) schwammen; letzteres ruhte auf einem kleinen Sandbad und wurde durch eine mässige Gasflamme erwärmt. Die Temperatur stieg von

50°—60° C. in 25 Min.
60°—70° C. » 35 »
70°—80° C. » 55 »

Also von 50°—60° C. in ungefähr 2 Stunden, oder im Durchschnitt 10° in 40 Min., 1° in 4 Min.

Was die Reaction der beobachteten Eiweisslösungen anbetrifft, so war sie niemals sauer, in der Regel neutral, und nur in den Fällen, wo es sich um natürliche Eiweisslösungen handelte, wie im Wasserextract der Krystalllinse, schwach alkalisch, weil die natürliche Alkalescenz nicht neutralisirt worden war.

Wenn nicht ausdrücklich etwas Anderes angegeben wird, so wurde jede Coagulationsprobe à 10 Cbcm. Eiweisslösung mit 3,3 Cbcm. gesättigter Kochsalzlösung versetzt, so dass die Mischung $^{1}/_{4}$ davon enthielt.

Der Thermometer wurde abgelesen, sobald das Eintreten von Fällung, wenn auch noch so feinflockig, deutlich bemerkt werden konnte.

2. Die Untersuchung der Circumpolarisation wurde an einigen Eiweisskörpern mit Hilfe von Wild's Polaristrobometer vorgenommen. Die specifische Rotation wurde aus dem Mittelwerth von 20 Ablesungen in zwei entgegengesetzten Quadranten (10 in jedem) berechnet, wobei eine 2 Dcm. weite Röhre angewendet und vorher weder Säure, Alkali, noch Neutralsalz der Eiweisslösung zugesetzt

wurde. Die Zimmertemperatur betrug während der Beobachtungen +10—15° C.

3. Gewichtsanalytische Bestimmungen. Bei dem Trocknen der zur Analyse bestimmten Präparate, sowie der Filter und Fällungen etc. wurde eine Temperatur von +105°—110° C. angewandt.

Die Bestimmung des Eiweissgehalts wurde in salzreichen Lösungen auf allbekannte Weise durch Coagulation in Wärme, in approximativ salzfreier Lösung, durch directe Eintrocknung, Wägung und Correction für den Aschegehalt ausgeführt. Stickstoff, Kohlenstoff und Wasserstoff wurden nach den bei Proteïnuntersuchungen nun allgemein gebräuchlichen Methoden bestimmt, nämlich nach Kjeldahl's Methode in ihrer ursprünglichen Geschick, sowie durch Elementaranalyse mit Verbrennung der Substanz in Platinschiffchen unter einem Sauerstoff-Gasstrom; Schwefel nach der von Hammarsten[1]) modificirten Liebig'schen Methode.

Das Filtrat vom Baryumsulphat wurde in einigen Fällen zur Phosphorbestimmung benutzt, indem der Ueberschuss an Baryt durch Ausfällung mit Schwefelsäure vollständig entfernt wurde, die Flüssigkeit, mit 100 Cbcm. Salpetersäure angesäuert, abgedampft, und die Phosphorsäure, nachdem der Rest in verdünnter Salpetersäure aufgelöst war, mit Molybdenflüssigkeit ausgefällt wurde. Der nach Verlauf eines Tages erhaltene Niederschlag wurde auf gewöhnliche Weise in Ammoniummagnesiumphosphat resp. Magnesiumpyrophosphat umgesetzt und gewogen.

Die Krystalllinse.

In grösserer Ausdehnung als eines der anderen lichtbrechenden Medien ist die Linse Gegenstand chemischer Untersuchungen gewesen, da über die Hälfte sämmtlicher Arbeiten über die lichtbrechenden Medien des Auges auf ihr Theil kommen. Nichtsdestoweniger müssen wir zugeben, dass wenige

---

[1]) «Ueber den Gehalt des Caseins an Schwefel und über die Bestimmung des Schwefels in Proteïnstubstanzen». Zeitschrift f. physiologische Chemie, Bd. 9, S. 273 (1885).

Gebiete, denen annähernd so zahlreiche Untersuchungen gewidmet worden, in so unaufgeklärtem Zustand geblieben sind, wie es mit der Chemie der Linse der Fall ist. Der Grund ist in mehreren Umständen zu suchen.

In erster Linie bietet unleugbar die Linse selbst Verhältnisse dar, die die Untersuchung der Linse und die Beurtheilung der erhaltenen Resultate in bedeutendem Maasse erschweren. Dazu kommt, dass die überwiegende Anzahl der Untersuchungen aus einer Zeit herstammt, da die Kenntniss der Eiweisskörper sehr unentwickelt war, und dass die wenigen Arbeiten (von Laptschinsky[1]), Béchamp[2]) und Cahn[3]), die in den letzten beiden Decennien zu Tage gefördert sind, nicht auch nur mässigen Ansprüchen auf Gründlichkeit genügen. Kein Zweifel also, dass eine erneute Untersuchung wünschenswerth erscheinen kann.

Was das Historische über dieses Kapitel anbetrifft, so will ich vorläufig nur das Wichtigste vorausschicken, um später, wenn die Gelegenheit sich bietet, auf die Details einzugehen.

Nach Berzelius[4]) (1830) sollte die Linse einen von den früher bekannten Eiweisskörpern verschiedenen Eiweissstoff, «*Krystallin*» oder «*Globulin*», enthalten, eine Auffassung, die später unverändert von Mulder[5]) (1840), Rüling[6]) (1846) und Lehmann[7]) (1853) getheilt wurde.

---

[1]) Ein Beitrag zur Chemie des Linsengewebes. Archiv f. die gesammte Physiologie (Pflüger's), Bd. 13, S. 631 (1876).

[2]) Recherches sur les matières albuminoïdes du cristallin, au point de vue de la non-identité de celles qui sont solubles, avec l'albumine du blanc d'oeuf et du serum. Comptes rendus. Bd. 90, S. 1255 (1880).

[3]) Zur physiologischen und pathologischen Chemie des Auges. Zeitschrift f. physiologische Chemie. Bd. 5, S. 213 (1881).

[4]) Lärobok i Kemien (1830), Del 6, S. 512.

[5]) Proteïn der Krystallinse. Journal f. praktische Chemie, Bd. 19, S. 189 (1840).

[6]) Bestimmung des Schwefels in den schwefel- und stickstoffhaltigen Bestandtheilen des Pflanzen- und Thierorganismus. Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. 58, S. 301 (1846).

[7]) Lehrbuch der physiologischen Chemie, Bd. 1, S. 360 (1853).

Für die Einheit des Eiweisses in der Linsenmasse sprachen sich ferner Lieberkühn[1]) (1852) und Vintschgau[2]) (1857) aus, aber wichen von Berzelius in der Ansicht über die Natur des Eiweisses ab, indem der erstere das Eiweiss der Linse für «*Alkalialbuminat*» hielt, der letztere hingegen erklärte, einen wesentlichen Unterschied zwischen dem Linseneiweiss und gewöhnlichem *Serumalbumin* nicht finden zu können.

Die erste Angabe, dass *mehr als ein* Eiweissstoff in der Linse nachgewiesen werden könnte, rührt schon von Simon[3]) (1842) her, und hat später in allen seit Anfang 1860 ausgeführten Untersuchungen Bekräftigung gefunden.

Wenn in diesem Punkte Einigkeit erlangt scheint, so kann man dieses in Bezug auf die Art der Eiweisskörper der Linse noch lange nicht sagen; auf die verschiedenen Auffassungen, die sich darüber geltend gemacht, kommen wir später zurück.

Im Allgemeinen ist man beim Studium der Eiweisskörper der Linse auf folgende Weise zu Wege gegangen. Die durch Reiben mit Sand zerdrückte Linsenmasse wurde mit Wasser oder einer Salzlösung vermischt; nach dem Filtriren verwandte man alle Sorgfalt auf die Untersuchung des erhaltenen Filtrats und glaubte durch die Prüfung desselben die Zusammensetzung der ganzen Linse klarlegen zu können. Aber wie ist man mit dem nicht löslichen Theil der Linse verfahren? Eigenthümlich genug hat man in einem solchen Grade den Umstand, dass kaum mehr als die Hälfte der Linsenmasse sich in Wasser oder Salzlösung (siehe unten) auflöst, bei Seite gesetzt, dass er in den meisten der Arbeiten nicht mit einem Worte erwähnt, geschweige denn einer Prüfung gewürdigt wird; die in dem Filtrat befindlichen Substanzen haben die Aufmerksamkeit ausschliesslich in Anspruch genommen. Die einzigen Verfasser,

---

[1]) Ueber Albumin und Casein. Annalen der Physik und Chemie (Poggendorff's), Bd. 86, S. 298 (1852).

[2]) Osservazioni chimiche sulle reazioni per le quali la cristallina si dovrebbe distinguere dall' albumina. Sitzungsberichte der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften (Wien), Bd. 24, S. 493 (1857).

[3]) Handbuch der angewandten medicinischen Chemie. Theil 2, S. 520 (1842).

welche der Linse auch einen unlöslichen Theil zuschreiben, sind Berzelius und Béchamp (siehe unten).

Unter solchen Umständen musste es meine Verwunderung erwecken, schon bei den ersten Versuchen, die Linsenmasse mit Wasser oder Salzlösungen zu extrahiren, einen offenbar grossen Theil darin vollkommen unlöslich zu finden. Doch war es erst nach quantitativen Versuchen, dass ich zur Einsicht kam, welch ein bedeutender Theil der Linsenmasse von einer in den genannten Lösungsmitteln unlöslichen Substanz gebildet wird.

Um das Verhältniss zwischen den löslichen und unlöslichen Bestandtheilen der Linse näher zu erforschen, wurde eine Reihe von Versuchen mit abwechselnder Anordnung angestellt.

Versuch 1. Ca. 30 Gr. Linsen wurden mit dest. Wasser (ungefähr 10 Cbcm. pro Gr. Linsenmasse) in einer Glasflasche geschüttelt, wodurch die Linsenfasern, eine Schicht nach der anderen, in der Flüssigkeit aufgeschlämmt wurden, und die Linsen, indem sie ihre runde Form behielten, allmälig an Grösse abnahmen. Als sie nach wiederholtem Schütteln in $1^1/_2$ Tagen auf die Grösse kleiner Erbsen heruntergegangen waren, wurden sie mit dem Pistill einer Reibeschale zerquetscht, worauf das Schütteln wieder fortgesetzt wurde, bis die ganze Linsenmasse nach einem weiteren halben Tag gleichmässig in der Flüssigkeit aufgeschlämmt war. Die Flüssigkeit war nun vollkomme nundurchsichtig in Folge der vielen aufgeschlämmten, weissen Partikeln, welche, beim Umrühren der Flüssigkeit, in auffallendem Licht betrachtet, einen schwach perlmutterartigen Schimmer, ähnlich dem von Cholesterin in einer Ovarialflüssigkeit, zeigte; unter dem Mikroskop ergab sich, dass sie aus lauter Linsenfasern, die ihre Conturen beibehalten hatten, bestand.

Aus 10 Cbcm. der Flüssigkeit wurde die Menge der Eiweisssubstanzen[1]) durch Eintrocknen in einer Platinschale

---

[1]) Genau genommen erhielt man hierdurch die Menge fester Substanzen, die indessen bei einer approximativen Bestimmung, wie die vorliegende, ohne weiteres als Bestimmung für die Menge der Eiweisssubstanzen angenommen werden kann, da die übrigen organischen Substanzen kaum 1 % der Linsenmasse ausmachen (Laptschinsky).

und Correction für den Aschegehalt auf 0,350 Gr. (d. h. *lösliche* + *unlösliche* Eiweisssubstanz) bestimmt.

Ein anderer Theil der Flüssigkeit wurde filtrirt, wobei Vorsichtsmassregeln getroffen wurden, um das Verdunsten zu verhüten; von dem klaren Filtrate wurden ebenso 10 Cbcm. abgemessen und die Menge der Eiweisssubstanzen auf 0,190 Gr. bestimmt (d. h. *lösliches* Eiweiss).

Durch Subtraction wurde erhalten:

0,160 Gr., welche den unlöslichen Theil der Eiweisssubstanzen darstellte, die in diesem Falle also 45,7 % der Total-Eiweissmenge ausmachen.

Versuch 2 wurde auf ganz dieselbe Weise angeordnet wie der vorhergehende Versuch, nur mit der Aenderung, dass hier 1/4 gesättigter Kochsalzlösung angewendet wurde, und dass die Eiweissbestimmungen durch die Coagulationsmethode ausgeführt wurden. Nach 2 Tagen wurde filtrirt:

10 Cbcm. der ursprüngl. Flüssigkeit = 0,354 Gr. (*total.* Eiweiss).
10 » » filtrirten » = 0,197 » (*löslich.* Eiweiss).

0,157 Gr. (*unlöslich.* Eiweiss).

Der unlösliche Theil machte also 44,3 % der Total-Eiweissmenge aus.

Versuch 3. Ca. 30 Gr. Linsen wurden in einer Reibschale mit einer reichlichen Menge ausgewaschenen Quarzsandes während 1/2 Stunde zerrieben, destillirtes Wasser (10 Cbcm. pro Gr. Linsenmasse) wurde allmälig während des Umrührens hinzugegossen, bis die ganze Linsenmasse gleichförmig aufgeschlämmt war. Nun wurde die Mischung in drei Portionen getheilt (a, b, c):

a) wurde *gleich* filtrirt:

10 Cbcm. der ursprüngl. Flüssigkeit = 0,352 Gr. (*total.* Eiweiss[1]),
10 » » filtrirten » = 0,170 » (*löslich.* Eiweiss),

0,182 Gr. (*unlöslich.* Eiweiss).

Unlöslicher Theil: 48.3 % der Total-Eiweissmenge.

[1]) Hier und im folgenden Versuche wird der bei Vers. 1 und 2 gefundene Mittelwerth (0,352 Gr.) angeführt, welcher natürlich vollkommen anwendbar ist, da das Verhältniss zwischen Linsenmasse und Lösungsmittel bei allen Versuchen dasselbe war (1 : 10). In diesem und dem

b) wurde zu wiederholten Malen in einer Glasflasche geschüttelt und *nach 2 Stunden* filtrirt:

10 Cbcm. der ursprüngl. Flüssigkeit = 0,352 Gr. (*total.* Eiweiss),
10 » » filtrierten » = 0,175 » (*löslich.* Eiweiss),

0,177 Gr. (*unlöslich.* Eiweiss).

Unlöslicher Theil: 50,3 %.

c) wurde zu wiederholten Malen in einer Glasflasche geschüttelt und *nach 2 Tagen* filtrirt:

10 Cbcm. der ursprüngl. Flüssigkeit = 0,352 Gr. (*total*-Eiweiss),
10 » » filtrirten » = 0,186 » (*löslich.* Eiweiss),

0,166 Gr. (*unlöslich.* Eiweiss).

Unlöslicher Theil: 47,1 %.

Versuch 4. Dieselbe Anordnung wie im vorhergehenden Versuche, nur dass 1/4 gesättigter Kochsalzlösung anstatt des Wassers angewendet wurde (Eiweissbestimmung mittelst Coagulation). Die Flüssigkeit wurde in 2 Portionen getheilt:

a) wurde *gleich* filtrirt:

10 Cbcm. der ursprüngl. Flüssigkeit = 0,352 Gr. (*total*-Eiweiss),
10 » » filtrirten » = 0,180 » (*löslich.* Eiweiss),

0,172 Gr. (*unlöslich.* Eiweiss).

Unlöslicher Theil: 48,9 %.

b) wurde nach wiederholtem Umschütteln *2 Tage später* filtrirt:

10 Cbcm. der ursprüngl. Flüssigkeit = 0,352 Gr. (*total*-Eiweiss),
10 » » filtrirten » = 0,173 » (*löslich.* Eiweiss),

0,179 Gr. (*unlöslich.* Eiweiss).

Unlöslicher Theil: 51,1 %.

Es liegt in der Natur der Sache, dass Bestimmungen dieser Art nur eine approximative Genauigkeit haben können; aber nichtsdestoweniger geht aus ihnen unzweideutig hervor:

1. dass beinahe die Hälfte der Linsenmasse (im Durchschnitt 48 %) in Wasser und Kochsalzlösung unlöslich ist, und

folgenden Versuche war es nämlich nicht möglich, die Total-Eiweissmenge zu bestimmen, da aufgeschlämmte, feine Sandtheile das Resultat getrübt hätten.

2. dass die Menge der unlöslichen Substanz, im Ganzen betrachtet, die gleiche Grösse erreicht, ob nun dest. Wasser oder $^1/_4$ gesättigter Kochsalzlösung als Lösungsmittel[1]) dient, und unabhängig davon ist, ob die Linsenfasern durch einfaches Aufschlämmen verhältnissmässig erhalten oder ob sie durch anhaltendes Reiben mit Quarzsand so weit möglich zerrissen worden sind; sowie im letzteren Falle unabhängig davon, ob das Lösungsmittel während zweien Stunden oder während zweier ganzen Tage auf sie eingewirkt hat.

Nachdem so das Vorhandensein einer unlöslichen und in reichlicher Menge in der Linse vorkommenden Substanz bewiesen worden war, lag es nahe bei der Hand zu untersuchen, in wie weit ihre Vertheilung in den verschiedenen Schichten der Linse eine gleichförmige oder ungleichförmige ist. Zu diesem Zwecke wurden folgende Versuche ausgeführt:

Versuch 1. Eine Partie Linsen wurde mit dest. Wasser (10 Cbcm. pro Linse) durchgeschüttelt, so dass ein Theil der Linsenmasse aufgeschlämmt wurde (Fraction A). Die auf diese Weise ihrem Umfange nach bedeutend reducirten Linsen wurden aufs neue mit destill. Wasser (10 Cbcm. pro Linse) geschüttelt, womit fortgefahren wurde, bis der grösste Theil davon aufgeschlammt war (Fraction B). Zum Schluss wurden die übrigbleibenden innersten Linsenkerne, nachdem sie mit einem Mörserpistill zerdrückt worden waren, in destill. Wasser (5 Cbcm. pro Linse) aufgeschlämmt (Fraction C).

Jede der also erhaltenen drei Flüssigkeitsfractionen wurde in 2 Theile getheilt (Portion a und Portion b).

a) wurde ohne Zusatz gleich filtrirt,

b) wurde mit Kochsalz bis ungefähr 10 % versetzt und nach einem Tage filtrirt.

Auf gewöhnliche Weise wurde nun in jeder der 3 Fractionen die Eiweissmenge bestimmt, indem von Portion a und Portion b je 10 Cbcm. sowohl vor wie nach dem Filtriren

---

[1]) Dieser Umstand wird durch das Resultat der auf der nächsten Seite angeführten Versuchsserie bestätigt.

genommen wurde, wobei die Differenz die Menge der unlöslichen Substanz anzeigte.

Fraction A.

a) Vor dem Filtriren 0,447 Gr.
nach » » 0,374 »

0,073 Gr.

Unlöslicher Theil = 16,4 % der ganzen Eiweissmenge.

b) Vor dem Filtriren 0,367 Gr,
nach » » 0,307 »

0,060 Gr.

Unlöslicher Theil = 16,4 % der ganzen Eiweissmenge.

Fraction B.

a) Vor dem Filtriren 0,218 Gr.
nach » » 0,101 »

0,117 Gr.

Unlöslicher Theil = 53,2 % der ganzen Eiweissmenge.

b) Vor dem Filtriren 0,187 Gr.
nach » » 0,086 »

0,101 Gr.

Unlöslicher Theil = 54,0 % der ganzen Eiweissmenge.

Fraction C.

a) Vor dem Filtriren 0,190 Gr.
nach » » 0,048 »

0,142 Gr.

Unlöslicher Theil = 74,7 % der ganzen Eiweissmenge.

b) Vor dem Filtriren 0,174 Gr.
nach » » 0,046 »

0,128 Gr.

Unlöslicher Theil = 73,6 % der ganzen Eiweissmenge.

Da die Anordnung im vorhergehenden Versuche die Möglichkeit nicht vollkommen ausschliesst, dass während dem Schütteln der Linse mit Wasser lösliches Eiweiss aus den inneren Schichten im voraus aufgelöst wird, und dies in wesentlichem Grad oder ganz und gar die Ursache von der gefundenen Ungleichmässigkeit in der Vertheilung löslicher und unlöslicher Eiweisssubstanzen in den äusseren und inneren Lagen der Linse sein kann, so wurde ein ähnlicher Versuch

angestellt, bei dem die oben genannte Möglichkeit ausgeschlossen wurde.

Versuch 2. 20 Linsen (48 Gr.) wurden mit Hilfe eines Hornmessers in drei Partien zerlegt: a) die äussersten Schichten (19 Gr.), b) die mittleren Schichten (12 Gr.), c) die innersten Schichten, d. h. die eigentlichen Kerne (17 Gr.). Jede Partie für sich wurde nun in 200 Cbcm. destill. Wasser aufgeschlämmt und nach 24 Stunden filtrirt. In 10 Cbcm. Flüssigkeit wurde vor und nach dem Filtriren die Menge des Eiweiss bestimmt.

Fraction A.

Vor dem Filtriren	0,246 Gr.
nach » »	0,194 »
	0,052 Gr.

Unlöslicher Theil = 21,1 % des Totaleiweiss.

Fraction B.

Vor dem Filtriren	0,142 Gr.
nach » »	0,074 »
	0,068 Gr.

Unlöslicher Theil = 47,8 % des Totaleiweiss.

Fraction C.

Vor dem Filtriren	0,372 Gr.
nach » »	0,132 »
	0,240 Gr.

Unlöslicher Theil = 64,5 % des Totaleiweiss.

Ein kolossaler Unterschied tritt also zwischen den äusseren und inneren Theilen der Linse in Bezug auf die Vertheilung der unlöslichen Substanz hervor, indem der Gehalt an unlöslicher Substanz beständig von aussen nach innen zunimmt. Darum ist es auch sehr wahrscheinlich, dass der Unterschied noch extremer hervorgetreten wäre, wenn man von einander noch weiter entfernte Schichten der Linse, z. B. das äusserste und das innerste Zehntel, untersucht hätte.

Als Resultate von dem niedrigen Gehalt an unlöslicher Substanz der äusseren Schichten einerseits und dem hohen Gehalt der inneren Schichten andererseits haben wir somit den aus der früher genannten Versuchsserie hervorgegangenen Werth von 48 % für die ganze Linse aufzufassen.

In Anbetracht dessen, dass die unlösliche Substanz alle übrigen Proteïnsubstanzen der Linse an Menge übertrifft und dass sie das eigentliche Gerüst der Linsenfasern bildet, verdient sie wohl eine nähere Untersuchung[1]).

Eine chemische Untersuchung der Proteïnsubstanzen der Linse vertheilt sich darum theils auf die in Wasser und Salzlösung unlöslichen Substanzen, theils auf die darin löslichen Eiweisskörper.

I. Die unlösliche Proteïnsubstanz der Linse.

(Albumoïd.)

Um die unlösliche Substanz von den löslichen Eiweisskörpern vollständig zu befreien, wurde eine sorgfältige Extraction mit Kochsalzlösung vorgenommen. Durch fleissiges Umschütteln der in einer Glasflasche enthaltenen Linsen mit $^1/_4$ gesättigter Kochsalzlösung wurden die Linsenfasern, Schicht für Schicht, in der Flüssigkeit aufgeschlammt. Durch Filtriren wurde das lösliche Eiweiss zum grössten Theile entfernt, worauf die auf dem Filter gesammelte Linsenmasse in einer reichlichen Menge Kochsalzlösung aufgeschlammt wurde. Nach Verlauf eines Tages, als die Hauptmasse der Linsenfasern sich auf den Boden des Gefässes gesenkt hatte, wurde die überstehende Flüssigkeit abdecantirt und der Bodensatz wieder in Salzlösung von gleicher Stärke aufgeschlammt, welches täglich wiederholt wurde, bis die Flüssigkeit beim Aufkochen keine Trübung mehr zeigte, und beim Prüfen mit der Heller'schen Probe keine Spur von vorhandenem Eiweiss zeigte.

Das Kochsalz wurde durch wiederholtes Aufschlammen in destill. Wasser und Decantiren entfernt; ebenso wenig wie

[1]) Es ist natürlich nicht in jedem Falle möglich, den Grund zu erkennen, warum die unlösliche Substanz, ungeachtet ihres reichlichen Vorkommens, der Aufmerksamkeit der Forscher im Allgemeinen entgangen ist. Indessen halte ich es für wahrscheinlich, dass in der beinahe überall vorgeschriebenen Weise, die Linse durch Reiben mit Sand zu zerreiben, eine Erklärung zu finden ist; man hielt die Trübung des Wassers ausschliesslich für eine Folge des beim Reiben theilweise zu feinem Mehl verwandelten Sandes, und schenkte daher dem Rest nach dem Filtriren keine Aufmerksamkeit.

die zuletzt angewandte Salzlösung verrieth dabei die Flüssigkeit den geringsten Eiweissgehalt.

Nachdem die Substanz zum Schluss auf einem Filter gesammelt war, bildete sie eine weisse, schwach perlmutterartig schimmernde, äusserst feinfaserige und ganz zusammenhängende Masse; unter dem Mikroskop zeigte sich, dass sie ausschliesslich aus Linsenfasern oder Bruchstücken davon bestand, die ihre Conturen gut erhalten hatten.

Die Substanz verhielt sich, zu Millon's Reagens, Adamciewic's Reagens, zu Salpetersäure, concentrirter Salzsäure in Allem wie ein Eiweisskörper, und gab beim Kochen mit alkalischer Bleilösung deutlich Reaction auf lose gebundenen Schwefel.

Beim Kochen mit verdünnter Salzsäure wurde kein reducirendes Product gebildet.

In Alkohol, Wasser und Salzlösungen verschiedener Art war die Substanz vollkommen unlöslich, in verdünntem Ammon und Essigsäure sehr schwer löslich.

Dagegen wurde sie mit Leichtigkeit und ohne Rest in verdünnten Mineralsäuren und fixen Alkalien gelöst.

Ihre saure Lösung wurde von einem weiteren Ueberschuss von Mineralsäure, ebenso wie von Ferrocyankalium- oder Kochsalzlösung gefällt.

Sowohl aus der mit Säure wie mit Alkali bereiteten Lösung konnte die Substanz *vollständig* durch Neutralisirung der Flüssigkeit ausgefällt werden.

Unter Digestion bei 40° C. der mit Pepsin versetzten Lösung in 0,2proc. Salzsäure entstand keine Fällung (Nucleïn).

Bemerkenswerth ist die bedeutend verschiedene Widerstandskraft der Substanz, einerseits gegen verdünntes Ammon oder Essigsäure, andererseits gegen verdünnte Kalilauge oder Salzsäure, wozu eine der vielen ausgeführten Versuchsserien als Beispiel dienen möge.

Die Linsenfasern wurden in Flüssigkeiten ungleicher Concentration aufgeschlämmt:

1. a) 0,05 procentige Kalilauge — vollständig gelöst in 10 Minuten.
   b) 0,05 procentiges Ammon — keine bemerkbare Einwirkung während 5 Tagen.

2. a) 0,1 procentige Kalilauge — vollständig gelöst in 3 Minuten.
   b) 0,1 procentiges Ammon — nach 6 Stunden: beinahe unverändert.
   » » nach 2 Tagen: viel ungelöst.
   » » » 5 » ein Theil noch ungelöst.
3. a) 0,5 procentige Kalilauge — augenblickliche Lösung.
   b) 0,5 procentiges Ammon — nach 6 Stunden: ein bedeutender Theil ungelöst.
   » » nach 1 Tage: ein kleiner Theil noch ungelöst.
   » » nach 2 Tagen: vollständig gelöst.
4. a) 0,1 procentige Salzsäure — in 5 Minuten das meiste gelöst.
   » » nach einer Stunde vollständig gelöst
   b) 0,1 procentige Essigsäure — nach 3 Stunden unverändert.
5. a) 0,2 procentige Salzsäure — vollständig gelöst in 5 Minuten.
   b) 0,2 procentige Essigsäure — nach 5 Tagen unverändert.
6. a)
   b) 0,5 procentige Essigsäure — in 5 Tagen keine bemerkbare Veränderung.
7. a)
   b) 2 procentige Essigsäure — nach 1 Tage: der grösste Theil ungelöst.
   » » nach 2 Tagen: ein bedeutender Theil ungelöst.
   » » nach 5 Tagen ein kleiner Theil noch ungelöst.

Eine Partie Linsenfasernsubstanz, die getrocknet und ohne vorhergehende Alkohol- oder Aetherbehandlung analysirt wurde, ergab folgende Werthe:

0,1155	Gr.	angew.	Substanz	—	16,61	°/₀	Stickstoff.
1,5245	»	»	»	—	0,77	»	Schwefel.
1,5245	»	»	»	—	0,05	»	Phosphor.
1,123	»	»	»	—	0,05	»	» [1]

Indem die angeführten Reactionen und analytischen Werthe deutlich die Proteïnnatur der in Frage stehenden Substanz an den Tag legen, geht zugleich aus ihren Löslichkeitsverhältnissen hervor, dass sie nicht zu einer Gruppe der typischen, nativen Eiweisskörper (Albumin-, Globulin- oder Nucleoalbumingruppen) geführt werden kann. Nichtsdesto-

[1]) Diese Phosphorbestimmung wurde in der Asche nach Verbrennung der Substánz ausgeführt. Aschegehalt 0,48 °/₀.

weniger muss sie aus Gründen, zu denen wir gleich übergehen werden, als ein wirklicher Eiweisskörper angesehen werden, und zwar, ebenso wie z. B. Fibrin, als ein unlöslicher.

Wie wir schon aus den Versuchen 1 und 2 auf S. 74 u. 75 gesehen, lösen sich die Linsenfasern leicht und klar in verdünnter Kalilauge von 0,05—0,1 %. Durch diese einfache Procedur wird die ursprüngliche Substanz in einen löslichen, albuminatähnlichen Eiweisskörper verwandelt, und diese Umwandlung geschieht so vollständig, dass keine Spur eines anderen Products, weder von eiweissartiger noch anderer Beschaffenheit, dabei gebildet wird.

Wenn nämlich die alkalische Flüssigkeit neutralisirt oder mit verdünnter Essigsäure sehr schwach sauer gemacht wird, entsteht eine reichliche, grobflockige Fällung, nach deren Entfernung durch Filtriren kein Eiweiss in dem klaren Filtrate zu finden ist, weder beim Aufkochen, noch beim Prüfen mit der Heller'schen Probe oder mit Gerbsäure. In dem geringen Rest des durch Verdunsten getrockneten Filtrats war ebenso wenig eine andere organische Substanz zu finden, besonders nicht Lecitin oder Cholesterin, nur Salze.

Die beim Neutralisiren ausgefällte Eiweisssubstanz ist, ebenso wie die ursprüngliche Linsenfasernsubstanz selbst, in Wasser und Neutralsalz-Lösungen vollständig unlöslich, löst sich dagegen mit grösster Leichtigkeit nicht nur in verdünnten Mineralsäuren und fixen Alkalien, sondern auch in verdünntem Ammon und Essigsäure.

Eine mit sehr wenig Alkali bereitete, nur äusserst schwach alkalisch reagirende Lösung wird durch folgendes Verhalten gekennzeichnet:

Kohlensäure — fällt *vollständig;* die Fällung ist unlöslich bei fortgesetzter Einleitung von Kohlensäure, eben sowie in Neutralsalzen.

Essigsäure — fällt *vollständig* beim Zusatz von ein bis zwei $^1/_{100}$ %; die Fällung löst sich wieder, wenn der Essigsäuregehalt auf 0,1 % erhöht wird. Die essigsaure Lösung wird durch überschüssige Mineralsäure und durch Ferrocyankalium gefällt.

Salzsäure — bei minimalem Zusatz wird die Substanz *vollständig* ausgefällt; die Fällung löst sich klar schon bei 0,02 % Salzsäuregehalt, um bei einem weiteren Ueberschuss an Säure wiederzukommen.

Gesättigte Kochsalzlösung (gleiches Volumen) — keine Fällung.
Gesättigte Lösung von Ammoniumsulphat oder Magnesiumsulphat (gleiche Volumen) — *vollständige* Fällung.
Sättigung mit festen Neutralsalzen (Ammoniumsulphat, Magnesiumsulphat, Natriumsulphat und Chlornatrium) — *vollständige* Fällung.

Alle Fällungen haben ein ganz grobflockiges Aussehen.

Die Coagulationstemperatur ist ungewöhnlich niedrig. Sie war in 4 verschiedenen Versuchen bei einem Kochsalzgehalt von 5—10% resp. + 43°, 45°[1]), 45° C.[2]) und 47° C.; nach fortgesetzter Erwärmung auf ungefähr + 50° C. und nachdem der Niederschlag durch Filtriren entfernt war, erwies sich die Flüssigkeit frei von Eiweiss. Durch Erwärmen auf ungefähr 50° C. konnte die Substanz also *vollständig* coagulirt werden.

Bei polarimetrischer Bestimmung an verschiedenen Präparaten wurde als Werth für $\alpha_{(D)}$ erhalten:

— 50,9° (2,33 proc. Lösung).
— 52,2° (2,51 proc. Lösung).

Nachdem die Substanz mit Essigsäure ausgefällt, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen war, bildete sie ein blendend weisses, lockeres Pulver, von dem mehrere Präparate analysirt wurden[3]).

Präparat	Substanz		Ergebnis	Element
Präp. No. I.	0,143 Gr. angew. Substanz	—	16,74 %	Stickstoff.
	1,046 » » »	—	0,77 »	Schwefel.
	(» » » »	—	0,04 »	Phosphor).
Präp. No. II.	0,1645 / 0,211 } Gr. angew. Substanz	—	16,64 %	Stickstoff.
	1,0865 » » »	—	0,82 »	Schwefel.
	(» » » »	—	0,06 »	Phosphor).
Präp. No. III.	0,158 Gr. angew. Substanz	—	16,60 %	Stickstoff.
	» » » »	—	0,80 »	Schwefel.
	(1,008 » » »	—	0,04 »	Phosphor).
	0,362 » » »	—	53,12 »	Kohlenstoff.
	» » » »	—	6,80 »	Wasserstoff.
Präp. No. IV.	0,169 / 0,225 } » » »	—	16,54 »	Stickstoff.
	1,258 » » »	—	0,76 »	Schwefel.

[1]) 0,48 procentige Lösung.
[2]) 1,16 procentige Lösung.
[3]) Aschegehalt ungefähr 0,30 %.

Präp. No. V. 0,136 Gr. angew. Substanz — 16,57 » Stickstoff.
0,8725 » » » — 0,81 » Schwefel.

Mittelwerth: 16,62 % Stickstoff.
0,79 » Schwefel.
53,12 » Kohlenstoff.
6,80 » Wasserstoff.

In Bezug auf die Zusammensetzung herrscht also nahe Uebereinstimmung zwischen der unlöslichen Substanz der Linsenfasern und dem daraus entstandenen löslichen Eiweisskörper, welches auch zu erwarten ist, da die erstere vollständig in den letzteren übergeht, ohne Bildung eines anderen Products. Aus diesem Grunde und aus Bequemlichkeitsrücksichten möchte ich der unlöslichen Proteïnsubstanz in den Linsenfasern den Namen: Albumoïd geben können. Was ihre löslichen Modificationen betrifft, so kommt sie durch ihre Fällbarkeitsverhältnisse den sogen. Albuminaten am nächsten.

Ein geringer Phosphorgehalt wurde beständig bemerkt, und dürfte von Calciumphosphat herrühren, das immer in der Asche nachgewiesen werden kann. Da es nicht gelang, durch stundenlanges, mehrmals wiederholtes Kochen mit Alkohol den Phosphorgehalt merklich niederzudrücken, kann derselbe nämlich nicht als aus Lecitin[1]) herrührend angesehen werden, ebenso wenig aus Nucleïn oder Nucleoalbumin, da die Nucleïnfällung bei der Digestion der gelösten Substanz in Salzsäure und Pepsin ausblieb. Im Uebrigen wurde die gleiche Menge Phosphor beim Einäschern des Albumoïds wie nach dessen Schmelzen mit Kaliumhydrat und Salpeter erhalten.

Ein Unterschied in Betreff der qualitativen Verhältnisse oder Zusammensetzung des löslichen Eiweisskörpers wurde in den Fällen, da 0,1 proc. Kalilauge unter wesentlich verschiedener Zeitdauer eingewirkt hatte, nicht verspürt, ob nun die alkalische Lösung schon nach den wenigen Minuten, die zur Lösung des Albumoïds vergingen, neutralisirt wurde, oder erst einen Tag später.

---

[1]) Eine Spur von Lecithin fand sich in der zur Extraction zuerst angewandten Alkoholportion, möglicherweise in den zweiten, aber nicht in den folgenden.

Erwähnenswerth erscheint mir, dass Albumoïd in der Linse mit Leichtigkeit auf eine mehr unmittelbare Weise, als die eben angeführte, nachgewiesen werden kann. Versetzt man einen mit destill. Wasser bereiteten, filtrirten Linsenextract mit verdünnter Essigsäure, oder leitet Kohlensäure ein, so entsteht eine Fällung, welche schnell und vollständig durch Kochsalz gelöst wird; wird der Wasserextract mit Kochsalz gesättigt, so entsteht keine Fällung. Wird dieselbe Probe an einem mit 0,1proc. Kalilauge hergestellten, filtrirten Linsenextract vorgenommen, so erweist sich die Fällung durch Essigsäure zu einem bedeutenden Theile, bei Zusatz von Kochsalz, nicht löslich, und eine Sättigung mit Kochsalz erzeugt in der nahezu neutralisirten Flüssigkeit eine reichliche Fällung — zwei Eigenschaften, die wir oben bei alkalischer Lösung von isolirtem Albumoïd kennen gelernt haben.

Natürlich liegt die Annahme nahe, der beobachtete Unterschied könnte seinen Grund in der verändernden Einwirkung des Alkali auf eine im Wasserextract vorkommende, lösliche Eiweisssubstanz haben, weswegen es nöthig war, einen Controllversuch anzustellen. Ein solcher mag in seinen Hauptzügen angeführt werden:

Ser. A. 4 Linsen wurden mit 200 Cbcm. Flüssigkeit gerieben und gleich filtrirt.

Prüfung des Filtrats nach 2 Stunden.

Lösungsmittel.	Verhältniss der Essigsäure-Fällung zu Kochsalz.	Verhalten des Filtrats bei Sättigung mit Kochsalz[1]).
1. Dest. Wasser . . .	Klar löslich	Verblieb klar.
2. 0,1procent. Ammon .	» »	» »
1. 0,1procent. Kalilauge	Sehr reichliche, unlösliche Fällung	Reichliche Fällung, die sich allmälig zu groben Flocken vereinigte.

Ser. B. Von einem filtrirten Linsenwasserextract (Eiweissgehalt 1,96 %) wurden Portionen à 40 Cbcm. abgemessen, denen die berechnete Menge Alkali, in 10 Cbcm. Wasser gelöst, zugesetzt wurde.

[1]) Nach approximativer Neutralisirung.

Prüfung nach 2 Stunden.

Lösungsmittel.	Verhältniss der Essigsäure-Fällung zu Kochsalz.	Verhalten des Filtrats bei Sättigung mit Kochsalz [1].
1. Dest. Wasser . . .	Klar löslich	Verblieb klar.
2. 0,1 procent. Ammon .	» »	» »
3. 0,1 procent. Kalilauge	» »	» »

Nach diesen und anderen ähnlichen Versuchen kann die soeben aufgestellte Möglichkeit mit Bestimmtheit zurückgewiesen werden, indem es sich zugleich deutlich zeigt, dass der mit 0,1 proc. Kalilauge bereitete Linsenextract in reichlicher Menge eine Substanz enthält, die im einfachen Wasserextract nicht vorkommt, und die Eigenschaften aufweist, welche wir oben dem durch ein umständlicheres Verfahren isolirten Albumoïd zuerkannt haben.

Von den beiden Forschern Berzelius[2]) und Béchamp[3]), welche schon früher einen unlöslichen Bestandtheil in der Linse entdeckt haben, hat nur der Letztere die Eigenschaften der unlöslichen Substanz mit einigen wenigen Worten berührt, wovon wir hier das Wichtigste in Uebersetzung wiedergeben.

«Wenn man die gut ausgewaschenen Linsenfasern in sehr verdünnter Salzsäure löst, so gibt die Lösung mit Ammoniak eine weisse Fällung, die, in Essigsäure aufgelöst, eine specifische Rotation von: $\alpha_{(D)} = -80{,}2^{\circ}$ besitzt. Ich schlage vor, dieses Product «Krystallfibrinin» zu nennen.»

Was die Fällbarkeit der Albumoïdlösung in Salzsäure betrifft, so habe ich, wie schon erwähnt, Gelegenheit gehabt, sie zu constatiren. Dagegen herrscht zwischen dem von Béchamp gefundenen Rotationswerth und dem von mir observirten ein bedeutender Unterschied, der sich indessen mit grosser Wahrscheinlichkeit durch das verschiedene Verfahren beim Lösen der Substanz erklären lässt, indem nämlich die

---

1) Nach approximativer Neutralisirung.

2) Loc. cit.

3) Loc. cit.

von Béchamp angewandten Lösungsmittel von mehr angreifender Beschaffenheit gewesen sein mögen.

II. Die löslichen Eiweisssubstanzen der Linse.

Ausser wirklichen Eiweisskörpern finden sich keine weiteren Proteïnsubstanzen in einem mit Wasser oder $^1/_4$ gesättigter Kochsalzlösung hergestellten, filtrirten Linsenextract, weswegen die Ausdrücke «lösliche Proteïnsubstanzen» und «lösliche Eiweisskörper» der Linse sich gleichkommen. Näher auf die Versuche einzugehen, die durch ihr negatives Resultat zu diesem Schlusssatz berechtigen, scheint mir nicht von Interesse zu sein, und ziehe ich es daher vor, unmittelbar zu der Frage überzugehen, die mehr als die meisten hierher gehörigen behandelt worden ist, nämlich zu der Frage über die Natur des löslichen Linseneiweisses.

Zu Anfang mögen einige allgemein orientirende mit Linsenwasserextract angestellte Versuche mitgetheilt werden:

1. Bei Digestion, nach Zusetzung von Salzsäure zu 0,2 $^0/_0$ und Pepsin, entstand keine Nucleïnfällung.

Es ist somit ausgeschlossen, dass Nucleoalbumin darin enthalten ist.

2. Vollständige Sättigung mit Magnesiumsulfat bei + 30° C. bewirkte eine kolossale, in Wasser wieder leicht lösliche Fällung. Das Filtrat gibt beim Aufkochen einen spärlichen Niederschlag, der nach verschiedenen Versuchen nur $^1/_{50}$—$^1/_{25}$ der ganzen Menge löslichen Eiweiss entspricht.

Folglich gehört das lösliche Eiweiss beinahe ausschliesslich zur Gruppe der Globulinsubstanzen.

Ein wenig albuminartiges Eiweiss kann möglicher Weise in der Linse vorkommen, aber wenn das der Fall ist, so kann das Albumin höchstens 2—4 $^0/_0$ der Totalmenge des löslichen Eiweissstoffes ausmachen (siehe unten).

3. Bei vollständiger Sättigung mit Kochsalz verblieb die Flüssigkeit klar.

Hierin stimmt das Globulineiweiss der Linse mit Vitellin überein und unterscheidet sich von den übrigen bekannten Globulinsubstanzen.

4. Unter keinen Umständen kann ein mit destill. Wasser oder einer Salzlösung bereiteter Linsenextract, direct oder nach Neutralisirung mit ein wenig Essigsäure, durch Verdünnung mit destill. Wasser gefällt werden.

Ebenso wenig entsteht eine Fällung durch Verdünnen der Lösung, welche man erhält, wenn man die durch Sättigung mit Magnesiumsulfat ausgefällte Globulinmasse, nachdem sie ausgepresst ist, in destill. Wasser löst.

In diesem Punkte weicht das Globulineiweiss in der Linse von den Globulinsubstanzen im Allgemeinen, Vitellin mit eingerechnet, ab.

5. Wenn Kohlensäure eingeleitet oder verdünnte Essigsäure vorsichtig zugesetzt wird, entsteht eine Fällung, welche schnell und klar durch Neutralsalze gelöst wird. Wenn die Fällung durch Filtriren entfernt wird, gibt das Filtrat beim Aufkochen fortfahrend einen sehr reichlichen Niederschlag und wird durch Sättigung mit Magnesiumsulfat gefällt.

Hieraus geht hervor, dass ein Theil des Globulineiweiss mit Kohlensäure oder Essigsäure direct ausgefällt werden kann, während dagegen ein anderer Theil unausgefällt zurückbleibt.

Nachdem wir uns durch die oben genannten Versuche einen Begriff über einige der wichtigsten Verhältnisse der löslichen Eiweisskörper verschafft haben, wollen wir auf die Beantwortung der Frage eingehen, in wie weit die Linse wirklich albuminartiges Eiweiss enthält, worüber frühere Forscher die allerverschiedensten Angaben gemacht haben.

Wenn es auch ohne Zweifel feststeht, dass diese Frage, genau genommen, bejahend beantwortet werden muss, so stimmt in Wirklichkeit diese Antwort viel mehr mit der von Cahn[1]) ausgesprochenen Ansicht über das absolute Fehlen von Albumin in der Linse überein, als mit anderen in der Litteratur vorkommenden Angaben, dass nämlich das Albumin einen Hauptbestandtheil der Linse bilden solle; so nach Laptschinsky[2]) ungefähr $^1/_4$ des Linseneiweisses, nach

---

[1]) Loc. cit.

[2]) Loc. cit.

Simon[1] $^3/_4$ davon. Noch weiter ging in dieser Richtung Vintschgau[2]), welcher behaupten zu können glaubte, alles Eiweiss in der Linse wäre Serumalbumin.

Die Menge des Albumin ist nämlich äusserst unbedeutend, und die nun angeführten Angaben über dessen reichliches Vorhandensein stützen sich, so viel wir nun wissen, auf offenbare Missgriffe in der Art und Weise der Untersuchung.

Der bei Sättigung mit Magnesiumsulfat nicht fällbare Theil des Linseneiweisses wurde in 3 verschiedenen Fällen auf 3,28, 2,38 resp. 4,00 % der Totalmenge des löslichen Eiweisses bestimmt, und es ist klar, dass diese Ziffern als Maximwerth für die Albuminmenge in diesem besonderen Falle angesehen werden müssen.

Zudem machte es eine nähere Untersuchung ganz annehmbar, dass der durch Sättigung mit Magnesiumsulfat nicht ausfällbare Eiweissstoff zum grössten Theil nicht aus Albumin, sondern aus einem unausgefällten Rest Globulineiweiss besteht. Für diese Auffassung sprechen folgende bei einer grossen Anzahl Versuche stets constatirte Beobachtungen.

Versetzt man das mit Magnesiumsulfat gesättigte Filtrat, welches, nachdem es einen Tag gestanden hat, von dem auskrystallisirten Salze decantirt worden ist, mit Essigsäure zu 0,5—1,0 %, so wird das übrig bleibende Eiweiss ausgefällt. Beim Versuche, die durch Filtriren gesammelte und zwischen Papier ausgepresste Eiweissfällung in destill. Wasser zu lösen, erwies diese sich jedoch als zum grössten Theile unlöslich darin, selbst nachdem man durch vorsichtiges Zusetzen äusserst verdünnter Kalilauge die Reaction genau neutral gemacht hatte; welches beweist, dass die Fällung hauptsächlich nicht aus Albumin bestanden haben kann.

Wird nun die ungelöste weisse Fällung, welche bei qualitativer Prüfung in allem mit einem Albuminat übereinstimmt, abfiltrirt, so erweist sich, dass die Flüssigkeit in geringer

---

[1]) Loc. cit.
[2]) Loc. cit.

Menge eine Substanz enthält, welche unzweifelhaft die Eigenschaften einer Albuminsubstanz besitzt.

Die dialysirte Lösung derselben wird durch Essigsäure, Kohlensäure, Magnesiumsulfat in voller Sättigung oder Ammoniumsulfat in $^{1}/_{2}$ Sättigung nicht gefällt; dagegen wird sie durch mehr Ammoniumsulfat gefällt und beim Aufkochen coagulirt.

Die Menge dieser Substanz entsprach in den nun angeführten drei Versuchen 0,62, 0,90 resp. 0,82 % der Totalmenge des löslichen Eiweissstoffes.

Da für ein weiteres Studium dieses albuminartigen Eiweisskörpers ein reichlicheres Untersuchungsmaterial, als das mir zu Gebote stehende, erforderlich ist, habe ich mich damit begnügen müssen, nur auf sein Vorhandensein hinzuweisen. Einer künftigen Untersuchung bleibt es unter anderem vorbehalten, zu erforschen, ob dieses Albumin, wie ja anzunehmen ist, wirklich mit Serumalbumin identisch ist.

Als Bekräftigung der Annahme, dass der in Wasser unlösliche, albuminartige Theil der Essigsäurefällung ein durch die Säure veränderter Rest von Globulineiweiss ist, der wahrscheinlich infolge des lösenden Einflusses etwaiger Extractivstoffe unausgefällt im Filtrat zurückbleibt, kann ich das Resultat einer Controllprobe anführen.

Eine mit Magnesiumsulfat ausgefällte Portion Globulineiweiss wurde in Wasser gelöst; die Lösung wurde in 2 Theile getheilt, mit 0,5 resp. 1,0 % Essigsäure versetzt und nach 2 Stunden mit Magnesiumsulfat ausgefällt. Beide Fällungen waren, nachdem sie ausgepresst worden waren, in destill. Wasser sum Theil unlöslich, selbst bei Zusatz von Alkali bis zu beinahe neutraler Reaction. Der unlösliche Theil zeigte die Fällungsreactionen von Albuminat.

Kürzlich durch besondere Umstände veranlasst, erscheint der an und für sich schon unbedeutende Albumingehalt, den die Magnesiumsulfat-Methode andeutet, doch noch grösser, als er in Wirklichkeit ist, da er factisch nicht mehr als ungefähr 1 % der Totalmenge löslichen Linseneiweisses ausmachen dürfte.

Der albuminartige Eiweisskörper gehört nicht einer besonderen Region der Linse zu, sondern ist sowohl in den äussersten wie den innersten Schichten zu finden, und, im Verhältniss zu dem übrigen löslichen Eiweiss, überall in nahezu gleicher Menge.

Natürlich richtet sich das meiste Interesse bei einer Untersuchung der löslichen Eiweisskörper der Linse auf das so reichlich repräsentirte *Globulin*eiweiss. Doch bietet auch dieses Kapitel dem Untersuchenden nicht unbedeutende Schwierigkeiten dar.

Beim Untersuchen des Linsenglobulineiweisses gibt es einen Weg, der besonders praktisch scheint, und der beim Untersuchen von Globulinen bei anderen Gelegenheiten eingeschlagen wird und gute Dienste leistet, nämlich mit einer Salzlösung von angemessener Stärke zu extrahiren. Dass man bei der Wahl dieser Methode von Anfang an so zu sagen auf einen Abweg geräth, der einen vom Hauptziel abführt, habe ich leider durch die resultatlosen Versuche fast eines halben Jahres erfahren müssen. Wahrscheinlich hat dieser Umstand einen hemmenden Einfluss auch auf frühere Untersuchungen ausgeübt und kann zum Theil Schuld daran sein, dass sich die Frage über die Beschaffenheit des löslichen Linseneiweissstoffes noch in so unaufgeklärtem Zustande befindet.

Alle Versuche, mit Neutralsalzen die verschiedenen Globulinsubstanzen der Linse von einander zu trennen, scheitern nämlich daran, dass die letzteren in ihrem Verhalten zu Neutralsalzen keinerlei Unterschied zeigen, und wenn man dadurch, dass man bei der Extraction der Linse eine Salzlösung benutzt, in die Lösung der Globulinsubstanzen eine bedeutende Menge Salz eingeführt hat, so hat man sich hiermit der Möglichkeit beraubt, mit anderen Mitteln die Globulinsubstanzen trennen zu können, da das Salz ein wesentliches Hinderniss hiergegen bildet.

Weit günstiger stellt sich die Sache, wenn man mit einem einfachen Wasserextract der Linse arbeitet[1]), aber selbst

---

[1]) Im Allgemeinen wurde dazu ungefähr 10 Cbcm. destill. Wasser pro Gr. Linsenmasse genommen.

wenn man der Charybdis der Salzlösungen glücklich entgangen ist, lauert noch Scylla in vielfacher Gestalt.

Es dürfte, besonders für künftige Untersuchungen auf diesem Gebiete, von Interesse sein, ehe wir uns zum Besprechen der einzelnen Globulinsubstanzen wenden, eine kleine Skizze über den Verlauf meiner Untersuchungen zu erhalten, da sie die Schwierigkeiten, denen der Forscher zunächst ausgesetzt ist, an den Tag legen.

Dabei wird es nöthig sein, aus dem folgenden Kapitel hier und da ein Detail vorauszunehmen.

Wenn ein Linsenwasserextract mit ganz wenig Essigsäure versetzt wird, so entsteht eine recht reichliche, äusserst feinflockige Fällung, die beim Filtriren mit Leichtigkeit von dem klaren Filtrate getrennt wird[1]).

Die Fällung zeigt die Reactionen eines typischen Globulins.

Das Filtrat lässt sich weder direct noch nach der Dialyse durch weiteren Zusatz von Essigsäure fällen, aber gibt beim Aufkochen einen sehr reichlichen Eiweissniederschlag.

Mein erster Gedanke war natürlich der, dass das nicht ausgefällte Eiweiss eine Albuminart wäre, wie auch Kühne[2]) und Laptschinsky[3]) angenommen haben (I).

Doch bald zeigte auch das unausgefällte Eiweiss seine Globulinnatur, da es für Magnesium- oder Ammoniumsulfat ($^1/_2$ Sättigung) fällbar war.

Die Sache schien sich also folgendermassen zu gestalten: hier gibt es zwei verschiedene Globulinarten, die eine durch

---

[1]) Bei diesem Punkte blieben Kühne und Laptschinsky stehen. Nachdem Kühne durch Fällen des Linsenextractes mit Kohlensäure und verdünnter Essigsäure das «Globulin» und «Kalialbuminat» fortgeschafft hatte, gab das Filtrat beim Erwärmen eine Fällung, die nach seiner Ansicht aus «gewöhnlichem Serumalbumin» bestand.

In der Fällung erkannte Laptschinsky ein Globulin, aber sagt in Bezug auf das im Filtrate zurückbleibende, durch Kohlensäure oder Essigsäure nicht fällbare Eiweiss: «Dieser Eiwessstoff scheint mit dem Serumalbumin übereinzustimmen; die Menge des löslichen Eiweissstoffes ungefähr 11 %» (der frischen Linse).

[2]) Lehrbuch der physiologischen Chemie (1868), S. 404.

[3]) Loc. cit.

Essigsäure fällbar (Nr. 1), die andere durch Essigsäure nicht fällbar (Nr. 2) (II).

Beim Bemühen, das nicht fällbare Globulin näher kennen zu lernen, machte ich die Entdeckung, dass auch dieses, wiewohl auf Umwegen, sich durch Essigsäure fällen lässt. Wenn nämlich das Filtrat von einer ursprünglichen Essigsäurefällung (nach Neutralisirung) mit Magnesiumsulfat gesättigt, das so ausgefällte «Globulin Nr. 2» in Wasser gelöst, und die Lösung nach der Dialyse mit Essigsäure geprüft wurde, entstand wiederum eine Fällung, die ebenso wie die erste in Neutralsalz leicht und klar löslich war. Nachdem die Fällung abfiltrirt war, wurde die Flüssigkeit mit Ammoniumsulfat gesättigt, die entstandene Globulinfällung in ein wenig Wasser gelöst, und die Lösung dialysirt und mit Essigsäure geprüft.

Nochmals entstand eine kleine Fällung von typischem Globulin. Durch Wiederholung dieser Procedur (im Ganzen 5—6 Mal) konnte schliesslich die ganze Eiweissmenge, Portion nach Portion, vollständig mit Essigsäure ausgefällt werden, wobei die Fällungen von Anfang bis zu Ende dieselbe Leichtlöslichkeit in Kochsalzlösung besassen.

Diese Entdeckung musste die Annahme von zwei verschiedenartigen Globulinsubstanzen bedenklich erschüttern und machte es ganz wahrscheinlich, dass die ganze Globulinmenge aus einer einzigen, für Essigsäure fällbaren Globulinsubstanz besteht, wenn auch ein unbekannter Factor auf ihre Fällbarkeit hindernd einwirkt (III).

Die Sache schien mir also, was die qualitativen Verhältnisse betraf, ziemlich entschieden, es galt jetzt nur noch, die Zusammensetzung dieses Globulinstoffes zu studiren.

Beim Untersuchen von verschiedenartig hergestellten Globulinpräparaten, bei welchen ich zufolge meiner Annahme, dass das Linsenglobulin von einer und derselben Art sei, übereinstimmende Zusammensetzungen erwartete, erlebte ich eine Ueberraschung.

Ein Präparat, das aus der ursprünglichen Fällung durch Essigsäure bestand, wies einen Schwefelgehalt von knapp 0,6 %

auf; ein Präparat, das hergestellt war, indem man das Filtrat von einer Essigsäurefällung zur Trockne concentrirte, erwies ungefähr doppelt so viel Schwefel, 1,16 %; während ein auf dieselbe Weise aus dem ganzen Wasserextract bereitetes Präparat 1,01 % enthielt.

Da ich durch Controlluntersuchung die Gewissheit gewann. dass die bedeutenden Unterschiede im Schwefelgehalt nicht auf der ungleichförmigen Verunreinigung der Präparate durch Sulfate[1]) beruhen, blieb mir nichts anderes übrig, als den Gedanken an die Unität des Linsenglobulineiweissstoffes wieder fahren zu lassen.

Das Vorhandensein einer schwefelarmen und einer schwefelreichen Globulinsubstanz war damit unzweifelhaft an den Tag gelegt (IV).

Aber in welchem Zusammenhang steht der eben entdeckte Unterschied in der Zusammensetzung mit der früher gemachten Wahrnehmung der ungleichen Fällbarkeit[2]) durch Essigsäure oder Kohlensäure? Die Antwort hierauf stellt sich verhältnissmässig einfach: die aus dem Wasserextract direct mit Essigsäure (oder Kohlensäure) ausgefällte Substanz wird ausschliesslich von einem schwefelarmen Globulin (α-Krystallin) gebildet; das Filtrat enthält ein anderes, schwefelreiches Globulin (β-Krystallin) und einen kleineren Rest des schwefelarmen.

Wir gehen zunächst zur Besprechung des α-Krystallins der Linse über.

α-Krystallin.

Die Isolirung dieser Globulinsubstanz ist nicht mit Schwierigkeiten verknüpft[3]). Ein filtrirter Wasserextract, bei dem entweder die *ganze* Linse oder nur ihre *äussere Hälfte*

[1]) Von präformirten Sulfaten wurde keine Spur im Linsenwasserextract entdeckt. Im Uebrigen zeigten die verschiedenen Präparate einen kolossalen Unterschied in ihrem Verhalten zu alkalischer Bleilösung.

[2]) Im natürlichen Wasserextract.

[3]) Doch muss man die auf Seite 95 angeführte Möglichkeit nicht übersehen, dass das Präparat bei einem Versuche α-Krystallin aus einem nur mit *inneren* Linsentheilen hergestellten Wasserextract zu bereiten, leicht mit β-Krystallin verunreinigt werden kann.

angewendet worden ist, wird allmälig mit verdünnter Essigsäure (0,02—0,04 % der Mischung) versetzt, bis eine reichliche, stets äusserst feinflockige Fällung eintritt[1]), die mit Leichtigkeit abfiltrirt wird. Nach 2—3 Mal wiederholter Lösung in 0,01proc. Ammon und Ausfällung mit Essigsäure (nun war meistens 0,005—0,01 % davon genügend) konnte die schliesslich erhaltene Fällung entweder für Elementaranalyse mit Alkohol und Aether behandelt, oder in äusserst verdünntem Ammon gelöst und somit in eine neutral reagirende, schwach opalescirende Flüssigkeit verwandelt werden.

Eine solche α-Krystallinlösung (die in dem Versuche, welchen wir nun anführen werden, 1,35 % enthielt) wird durch folgendes Verhalten zu verschiedenen Reagenzen gekennzeichnet:

Magnesiumsnlphat:
a) Gleiches Volumen gesättigte Lösung — keine Fällung.
b) Sättigung bei Zimmerwärme — nur eine Spur von Fällung.
Sättigung bei +30° C. — *vollständige* Fällung.

Natriumsulphat:
a) Sättigung bei Zimmerwärme — nur eine Spur von Fällung.
b) Sättigung bei +30° C. — *vollständige* Fällung.

Ammoniumsulphat:
a) 1 Volumen gesättigter Lösung — sehr reichliche, aber nicht absolut vollständige Fällung.
b) 1½ Volumen gesättigter Lösung — *vollständige* Fällung.

Chlornatrium:
Sättigung, sowohl bei Zimmerwärme wie bei +30° C. — *keine* Fällung.

Kohlensäure:
a) Nach Einleiten eines Kohlensäurestromes während einiger Minuten — *vollständige* Fällung.

---

[1]) Die gefällte Mischung klärte sich augenblicklich beim Zusatz von ein wenig Kochsalz. Wenn ein Theil davon bei Seite gestellt und später geprüft wurde, zeigte sich die Fällung noch nach 5 Tagen beim Zusatz von Kochsalz vollständig löslich, obgleich die Lösung, je längere Zeit verstrichen war, eben langsamer vor sich ging.

Nachdem die Fällung 5 Tage gestanden, abfiltrirt und in sehr verdünntem Ammon gelöst war, wurde sie aufs Neue mit Essigsäure gefällt, und war dann wieder in Kochsalz augenblicklich klar löslich; ein Theil der Flüssigkeit wurde mit Kochsalz gesättigt, ohne das Fällung entstand.

b) Auch wenn der Kohlensäurestrom während $^1/_2$ Stunde fortging, blieb das Filtrat absolut frei von Eiweissstoff — die Fällung also durch einen Ueberschuss an Kohlensäure nicht löslich.

c) Nach einem Zusatz von Chlornatrium bis 0,5 % — keine Fällung durch Kohlensäurestrom; nach Verdünnung bis 0,25 % Kochsalzgehalt — fortwährend keine Fällung.

Nach vorhergehendem Zusatz von Chlornatrium bis 0,125 % — unvollständige Fällung; wenn diese Fällung abfiltrirt wurde, gab das Filtrat (obschon stark globulinhaltig), selbst bei starker Verdünnung und Zuführung von Kohlensäure keine weitere Fällung, — also entsteht in salzhaltiger Flüssigkeit unter keinen Umständen vollständige Fällung durch Kohlensäure.

d) Die Fällung durch Kohlensäure — klar löslich beim Zusatz einer geringen Menge Neutralsalz (selbst nach 24 Stunden).

Wird auch vollständig gelöst, wenn ein Luftstrom durch die gefällte Flüssigkeit geführt wird; ist dagegen die Fällung abfiltrirt, d. h. das Globulin von seinem (in Bicarbonat verwandelten) Alkali getrennt, so kann es, in ein wenig Wasser aufgeschlammt, durch einen Luftstrom nicht aufgelöst werden.

Essigsäure:

a) Bei einem Gehalt von ungefähr 0,01 % — vollständige Fällung. Bei einem Gehalt von ungefähr 0,03 % — die Fällung wiederum klar gelöst.

b) Bei einem Zusatz von Chlornatrium bis 0,5 % — war viel mehr Essigsäure erforderlich, um eine Fällung hervorzubringen, und diese war sehr unvollständig.

c) Die Fällung — klar löslich durch Neutralsalz.

Salzsäure:

a) Bei einem Gehalt von 0,0075 % — vollständige Fällung. Bei einem Gehalt von 0,015 % — die Fällung wiederum klar gelöst.

b) Die Fällung — klar löslich durch Neutralsalz.

Alkalische Bleilösung:

Erwärmung damit — kaum bemerkbare, gelbliche Färbung.

Verdünnung mit Wasser:

a) der Lösung direct — keine Trübung oder Fällung.

b) nach Ausfällung des Globulins mit Essigsäure und Auflösen desselben mit einem Minimum Kochsalz — gleichfalls keine Trübung oder Fällung.

Die Coagulationstemperatur war für diese 1,35 proc. α-Krystallinlösung + 73° C., nach Verdünnung der letzteren mit dem gleichen Volumen Wasser 73,5° C.[1]). Beim Prüfen

[1]) Bei einem Zusatz von Chlornatrium bis $^1/_4$ Sättigung; direct aufgekocht coagulirte die Lösung nicht, sondern wurde nur opalescent.

der α-Krystallinlösungen verschiedener Versuche wurden folgende Temperaturgrade erlangt:

	71°	für eine 0,84 procent. Lösung ($^1/_4$ gesättigt. NaCl).
	71,5°	» » 1,40 procent. » » »
	74°	» » 1,65 procent. » » »
	71°	» » 0,77 procent. » » »
	72°	» » 1,30 procent. » » »
	72°	Concentration der Lösung nicht bestimmt ($^1/_4$ gesättigt. NaCl).
	70,5°	» » » » » » »
	74°	» » » » » » »
	73°	» » » » » » »
Dieselbe Lösung.	72°	» » » » » » »
	71,5°	» » » » » $^1/_8$ gesättigt. »
	71,5°	» » » » » $^1/_2$ gesättigt. »

Die mittlere Temperatur für die Coagulation des α-Krystallin war also ungefähr + 72° C.

Für polarimetrische Untersuchung eigneten sich α-Globulinlösungen nicht gut, da die allzeit vorhandene, wenn auch an sich ganz schwache Opalescenz eine genaue Ablesung wesentlich erschwerte, weswegen nur eine Bestimmung ausgeführt wurde. Dabei wurde erhalten:

$$\alpha_{(D)} = 46{,}9^{\circ} \text{ (Lösung 3,29 proc.).}$$

Mit Alkohol (warm und kalt) sowie mit Aether behandelt und im Exsiccator getrocknet, bildete das α-Krystallin ein blendend weisses, lockeres Pulver. Seine elementare Zusammensetzung geht aus folgenden Analysen hervor[1]):

Präp. No. I.	0,171	Gr.	angew.	Substanz	— 16,62 %	Stickstoff.
	1,274	Gr.	»	»	— 0,59 %	Schwefel.
	0,329	Gr.	»	»	— 52,88 %	Kohlenstoff.
	»	Gr.	»	»	— 7,09 %	Wasserstoff.
Präp. No. II.	0,1385	Gr.	»	»	— 16,57 %	Stickstoff.
	1,373	Gr.	»	»	— 0,57 %	Schwefel.
Präp. No. III.	0,161 / 0,195	Gr. / Gr.	»	»	— 16,78 %	Stickstoff.
	1,172	Gr.	»	»	— 0,52 %	Schwefel.
	(»	Gr.	»	»	— 0,09 %	Phosphor.)

[1]) Aschegehalt der Präparaten 0,3—0,5 %. Was den Phosphorgehalt anbetrifft, so gilt auch hier das auf Seite 78 Angeführte.

Präp. No. IV.	0,206	Gr. angew. Substanz	— 16,71 %	Stickstoff.
	1,156	Gr. » »	— 0,60 %	Schwefel.
	(»	Gr. » »	— 0,07 %	Phosphor).
Präp. No. V.	0,170	Gr. » »	— 16,70 %	Stickstoff.
	1,2095	Gr. » »	— 0,53 %	Schwefel.
	(»	Gr. » »	— 0,11 %	Phosphor).
	0,381	Gr. » »	— 52,79 %	Kohlenstoff.
	»	Gr. » »	— 6,79 %	Wasserstoff.

Mittelwerth: 16,68 % Stickstoff.
0,56 % Schwefel.
52,83 % Kohlenstoff.
6,94 % Wasserstoff.

Mit dem eben angeführten Factor vor Augen braucht man nicht länger zu zweifeln, dass die in Frage stehende Globulinsubstanz, das α-Krystallin der Linse, nicht mit dem allgemein bekannten Paraglobulin identisch sein kann, sondern im Gegentheil wenig mit diesem übereinstimmt, ausser in den gemeinsamen Reactionen aller Globulinsubstanzen. Es genügt, an die Nichtfällbarkeit durch Kochsalz, bei Verdünnung oder bei Dialyse, an den hohen Stickstoffgehalt (Paraglobulin = 15,85 %) und ungewöhnlich geringen Schwefelgehalt (Paraglobulin = 1,11 %) und daraus folgenden Mangel an bleischwärzenden Schwefel des α-Krystallin zu erinnern.

Dennoch ist die aus einem Wasserextract der Linse durch Essigsäure oder Kohlensäure fällbare Globulinsubstanz ganz allgemein für Paraglobulin ausgegeben worden.

Aus einer Arbeit von Alex. Schmidt[1]) rührt folgende Aussage her:

«Aus einer Linsenlösung wird durch Kohlensäure oder verdünnte Essigsäure wie aus dem Blutserum nur ein Theil der organischen Substanz gefällt; dieser Niederschlag, von der Flüssigkeit getrennt, verhält sich in allen Stücken wie das Serumglobulin . . . .»

Nach Gorup-Besanez[2]) «verhält sich der Globulin-Niederschlag dem Paraglobulin, der fibrinoplastischen Substanz,

[1]) Weiteres über den Faserstoff und die Ursachen seiner Gerinnung. Archiv f. Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin (1862), S. 428.

[2]) Lehrbuch der physiologischen Chemie (1878), S. 656.

vollkommen gleich»; nach Kühne[1]) sollte eine Lösung «Krystallin» alle Reactionen von Paraglobulin geben, doch nicht wie dieses fibrinoplastisch wirken.

Solche Angaben können nun, meiner Meinung nach, nicht länger aufrecht erhalten werden.

Mehr Werth muss auf die in der Litteratur vorkommenden Angaben über das Vorhandensein von Vitellin in der Linse gelegt werden. Doch hat bis jetzt Niemand die aus dem Wasserextract durch Kohlen- oder Essigsäure direct fällbare Globulinsubstanz mit Vitellin identificiren wollen, sondern man hat, so weit ich aus den sparsamen Mittheilungen hierüber sehen kann, Vitellin *neben* der auf die genannte Weise gefällten Globulinsubstanz (Krystallin) nachweisen zu können geglaubt.

So nennt z. B. Gorup-Besanez[2]) als Bestandtheile der Linse: Serumalbumin, Globulin und «einen vitellinähnlichen Eiweisskörper».

Nachdem Laptschinsky[3]) anscheinend seinen Bericht über das Globulin, das durch Fällen des Wasserextractes mit Kohlensäure hergestellt wird, abgeschlossen hat, fügt er hinzu: «Es verdient noch hervorgehoben zu werden, dass wir aus der Linse eine mit dem Vitellin in ihren Reactionen übereinstimmende Globulinsubstanz darstellen können . . . . .» Die Herstellungsweise selbst führt er nicht an.

Ebenso wenig spricht Hoppe-Seyler[4]) sich bei Darstellung des Vitellin aus der Linse über dessen Zusammenhang mit dem aus dem Wasserextract durch Kohlen- oder Essigsäure direct fällbaren Globulin aus, sondern gibt er für dessen Herstellung ein besonderes Verfahren an: «Aus Krystalllinsen zieht man das Vitellin nach ihrem Zerschneiden und Zerreiben mit Steinsalzstückchen in der Porzellanschale mit Wasser aus . . . . Die filtrirte Lösung wird mit viel Wasser

---

[1]) Loc. cit.
[2]) Loc. cit.
[3]) Loc. cit.
[4]) Handbuch der physiologischen und pathologischen chemischen Analyse (1883), S. 273.

und einem Strom CO_2 oder vorsichtigem Zusatz von Essigsäure gefällt, gewaschen und getrocknet».

Diesen Angaben kann ich doch nicht beistimmen, insoweit man nämlich die für Kohlensäure direct aus dem Wasserextract fällbare Substanz für die eine Globulinart, das gefundene vitellinähnliche Globulin für eine andere hält.

Die einzige Substanz der Linse, die wirklich in vielem dem Vitellin gleicht, und welche, nach Hoppe-Seyler's Vorschrift für Herstellung des Vitellin, einzig dabei ausgefällt wird (siehe S. 90, unter Kohlensäure, c.), ist gerade das für Kohlensäure direct aus dem Wasserextract fällbare α-Krystallin, und wenn man *in diesem* eine Vitellinsubstanz sehen will, habe ich nichts besonderes dagegen einzuwenden. Unfällbarkeit für Chlornatrium, übereinstimmende Coagulationstemperatur (Vitellin + 75° C.) und auffallend niedriger Schwefelgehalt (nach Weyl[1]) enthält das Vitellin der Paranuss = 0,55%) führen sie gewiss nahe zusammen.

In einer Hinsicht unterscheidet sich das α-Krystallin doch vom Vitellin: seine Lösung lässt sich unter keinen Umständen durch Verdünnen mit Wasser fällen, während Vitellin bei derselben Behandlung mit ungewöhnlicher Leichtigkeit, leichter sogar als Myosin (Hoppe-Seyler[2]), gefällt wird.

Desswegen sollte das α-Krystallin, obgleich im Uebrigen nahe mit Vitellin verwandt, als eine der Linse eigenthümliche Globulinsubstanz angesehen werden.

Da aus einem vorhergehenden Versuche (S. 89 und 90) erhellt, dass das α-Krystallin sich absolut vollständig durch Kohlensäure oder verdünnte Essigsäure ausfällen lässt, könnte es einfach erscheinen, das andere, durch diese Reagenze nicht direct fällbare, schwefelreiche β-Krystallin, frei von α-Krystallin, zu erhalten, indem man z. B. das letztere durch Essigsäure aus dem Wasserextract entfernt. Eine solche absolute Fällbarkeit besitzt indessen nur das reine, von Extractivstoffen und Salzen freie α-Krystallin, nicht aber in gleichem Masse

[1]) Zur Kenntniss thierischer und pflanzlicher Eiweisskörper. Zeitschrift f. physiologische Chemie, Bd. 1, S. 72 (1878).

[2]) Loc. cit.

ein aus der *ganzen* Linse oder nur aus deren *äusserer* Hälfte bereiteter, natürlicher Linsenextract.

Beim Versuche, das α-Krystallin auszufällen, bleibt immer ein im ersteren Falle[1]) kleinerer, im letzteren Falle[2]) grösserer Theil davon unausgefällt und verunreinigt das β-Krystallin, wahrscheinlich in Folge des modificirenden Einflusses der, besonders in den äusseren Schichten der Linse reichlich vorkommenden Extractivstoffe und Salze.

Aber andererseits ist auch die allgemeine Regel, dass nicht einmal der kleinste Theil des schwefelreichen β-Krystallins mit Essig- oder Kohlensäure direct aus dem Linsenextract ausgefällt werden kann, einer gewissen Einschränkung unterworfen. Wird nämlich nur das *innere* $^1/_3$ oder $^1/_4$ der Linsenmasse, nachdem die entsprechenden äusseren Theile entfernt sind, extrahirt, so gibt der Extract mit Essigsäure eine Fällung[3]), die nicht allein die ganze in der Flüssigkeit befindliche Menge α-Krystallin, sondern auch einen Theil des schwefelreichen α-Krystallin enthält, indem die Fällung, selbst wenn sie durch wiederholtes Lösen und Fällen gereinigt ist, eine ziemlich reichliche Menge bleischwärzenden Schwefel aufweisen kann.

Hierin liegt ein deutlicher Fingerzeig, wie man am besten verfährt, um die beiden Globulinsubstanzen zu isoliren. Um α-Krystallin zu erhalten, arbeite man mit einem Extract, der die *äussere* Hälfte der Linsenmasse, entweder allein oder mit der inneren vereinigt (d. h. die ganze Linsenmasse), enthält; beabsichtigt man dagegen, β-Krystallin herzustellen, so benutze man einen Extract, bei dessen Bereitung die äusseren Theile (mindestens $^2/_3$ der Linsenmasse) entfernt und *nur die inneren* beibehalten worden sind. Erst nachdem ich durch zahlreiche misslungene Versuche gelernt hatte, wie nothwendig es ist hierauf Rücksicht zu nehmen, nahmen die anfangs scheinbar trostlosen Versuche eine günstigere Wendung.

---

[1]) Der Schwefelgehalt des Eiweisses im Filtrat (Gemenge der Eiweisskörper) machte in 2 untersuchten Fällen 1,16 % resp. 1,20 %.

[2]) Der entsprechende Schwefelgehalt war in einem Falle = 1,09 %.

[3]) In diesen Theilen der Linse überaus weniger als in den äusseren Theilen (siehe unten).

Für diese Wahl des Materials spricht noch ein anderer Grund, nämlich die sehr ungleichförmige Vertheilung und Reichlichkeit der beiden Substanzen in den verschiedenen Schichten der Linse: das α-Krystallin nimmt, von aussen nach innen gerechnet, rasch ab, während das β-Krystallin eine entsprechende Zunahme erfährt, so dass dieses Globulin im Centrum der Linse (z. B. im innersten $^1/_8$) so gut wie allein vorkommt. Ein Beweis hierfür mag angeführt werden.

Eine grössere Partie Linsen wurden mit destill. Wasser zu 3 verschiedenen Malen durchgeschüttelt.

Während sie einige Minuten lang (mit 10 Cbcm. Wasser pro Linse) geschüttelt wurden, schlammten ungefähr die äusseren $^3/_8$ der Linsenmasse auf (Fract. A).

Nach 4 Stunden langem Schütteln mit erneutem Wasser (10 Cbcm. pro Linse) waren ungefähr die nächsten $^3/_8$ aufgeschlammt (Fract. B).

Schliesslich wurden die übrig bleibenden Linsenkerne, die ungefähr $^1/_8$ der Linsenmasse ausmachten, durch 6stünd. Umschütteln mit 5 Cbcm. Wasser pro Linse zum Aufschlammen gebracht (Fract. C).

Nach dem Filtriren wurden die 3 Fractionen, jede für sich, untersucht.

Bei vorsichtigem Zusatz von Essigsäure zeigten sich folgende Unterschiede:

Fract. A — sehr reichliche Fällung, die von der Flüssigkeit getrennt, keinen bleischwärzenden Schwefel enthielt.

Fract. B — eine vielfach geringere Fällung als in der vorhergehenden Fraction; die Fällung gab, selbst nachdem sie gereinigt war, eine recht starke Reaction auf lose gebundenen Schwefel.

Fract. C — die Fällung vielmals geringer als in Fraction B; nach der Reinigung gab sie eine starke Schwärzung beim Probiren mit Bleiacetat und Kalilauge.

Nicht weniger ausgeprägt zeigte sich der Unterschied zwischen den verschiedenen Fractionen bei quantitativer Schwefelbestimmung aus der Mischung ihrer Eiweisskörper[1]).

---

[1]) Durch Concentriren zur Trockne, Pulverisiren und Trocknen der respectiven Filtrate erhalten.

Fract. A.	1,917 Gr. angew. Substanz	—	*0,89 %*	*Schwefel.*
	(1,723 Gr. » »	—	2,61 %	Asche).
Fract. B.	1,347 Gr. » »	—	*1,06 %*	*Schwefel.*
	(0,982 Gr. » »	—	1,73 %	Asche).
Fract. C.	1,447 Gr. » »	—	*1,27 %*	*Schwefel.*
	(1,182 Gr. » »	—	1,36 %	Asche).

Zum Vergleiche füge ich hier das Resultat eines auf dieselbe Weise analysirten Wasserextracts der *ganzen* Linse hinzu (α-Globulin + β-Globulin + Albumin):

1,684 Gr. — *1,01 % Schwefel.*

β-Krystallin.

Ein weiteres Motiviren der Nothwendigkeit, sich an die inneren Theile der Linse zu halten, wenn man ein möglichst reines β-Krystallin herstellen will, wird wohl überflüssig sein. Das Verfahren gestaltet sich also folgendermassen:

Nachdem man durch Umschütteln mit Wasser die äusseren $^3/_4$—$^4/_5$ der Linsenmasse entfernt hat, behandelt man das übrig bleibende, $^1/_4$—$^1/_5$, auf dieselbe Weise mit Wasser (z. B. 10 Cbcm. pro Linse), worauf es filtrirt wird. Das Filtrat wird sehr vorsichtig mit verdünnter Essigsäure versetzt, und die spärliche Fällung, dir ausser dem Rest des α-Krystallins auch einen Theil des β-Krystallins enthalten kann, wird abfiltrirt.

Zum Zweck qualitativer Untersuchung wird das β-Krystallin aus dem neutralisirten Filtrat mittelst Magnesiumsulfat ausgefällt, ausgepresst und durch Dialyse von Salz befreit.

Für die elementare Untersuchung kann das Filtrat dagegen direct oder nach Concentrirung durch Alkohol gefällt werden, indem der unbedeutende Theil albuminartigen Eiweissstoffes, der darin enthalten ist, nicht in bemerkbarem Masse auf das Resultat der Analyse einwirken kann.

Eine auf ebengenannte Weise hergestellte, dialysirte Lösung der β-Krystallin wird *vollständig* durch Sättigung mit Natrium- oder Magnesiumsulphat (bei + 30° C.) gefällt, ebenso durch $1^1/_2$ Volumen gesätt. Ammoniumsulphatlösung, dagegen *nicht* durch Chlornatrium; beim Verdünnen mit Wasser — keine

Fällung. In diesen Beziehungen herrscht vollständige Uebereinstimmung mit α-Krystallin.

Essigsäure oder Kohlensäure ruft eine in Neutralsalz leicht lösliche Fällung hervor, aber die Ausfällung der Substanz ist lange nicht vollständig; die Hauptmasse des Globulins bleibt unausgefällt. Wenn man den auf S. 87 beschriebenen Umweg einschlägt, so kann man jedes Mal eine neue Portion ausgefällt bekommen, und nach 5—6maliger Wiederholung der Procedur kann das β-Krystallin vollständig ausgefällt sein.

Die Ursache hierzu lässt sich nicht leicht mit Bestimmtheit beurtheilen. Eine Veränderung des β-Krystallin während der langdauernden Procedur ist ja am ehesten denkbar, aber dass sie nicht wesentlich ist, zeigt sich daraus, dass die successiv erhaltenen Globulinfällungen, von der ersten bis zur letzten, bei Zusatz von Kochsalz leicht löslich sind.

Beim Kochen mit Bleiacetat und Kalilauge entsteht reichliche schwarze Färbung und, wenn die Erwärmung fortgesetzt wird, Ausfällung von Schwefelblei.

Die Coagulationstemperatur des β-Krystallin beträgt ungefähr + 63° C., wie zahlreiche Versuche zeigen[1]):

62°	für	eine	1,80 procentige	Lösung.
61,5°	»	»	3,12 procentige	»
63°	»	»	0,51 procentige	»
64°	»	»	0,70 procentige	»
64°	»	»	1,80 procentige	»
63°	»	»	0,15 procentige	»

Ausser diesen für Lösungen von bekanntem %-Gehalt geltenden Gradzahlen wurden eine Anzahl Temperaturwerthe beim Prüfen von Lösungen, deren Globulingehalt nicht bestimmt war, erhalten, wobei

3	St.	bei	62°	coagulirten
7	»	»	62°	»
1	»	»	63,5°	»
1	»	»	64°	»

[1]) Wenn die Lösungen ohne vorhergehenden Zusatz von Neutralsalz zum Kochen gebracht wurden, blieb die Coagulation aus.

In Uebereinstimmung hiermit entsteht in jedem, ungefähr bis zu diesem Temperaturgrade erwärmten, natürlichen Linsenwasserextract eine reichliche Coagulation. Ziemlich constant ist jedoch bei solchen Versuchen 1—2° höhere Wärme erforderlich, als bei der Coagulation des isolirten β-Krystallins, was wohl dem modificirenden Einflusse anderer im Wasserextract enthaltener Substanzen, besonders des freien Alkalis[1]), zugeschrieben werden muss. Von 20 derartigen Coagulationsbestimmungen gaben nämlich:

2 St. — 63°
7 » — 64°
4 » — 64,5°
5 » — 65°
2 » — 65,5°.

Die specifische Rotation des β-Krystallin wurde in zwei Fällen bestimmt, und zwar auf:

$\alpha_{(D)} = 43,3°$ (3,12proc. Lösung),
$\alpha_{(D)} = 43,1°$ (1,80proc. »).

Einige β-Krystallinpräparate wurden mit folgendem Resultate analysirt:

Präp. No. I	0,228 / 0,1515	Gr.	angew.	Substanz	—	17,09 %	Stickstoff.
	1,231	Gr.	»	»	—	1,25 %	Schwefel.
	(1,182	Gr.	»	»	—	1,36 %	Asche[2]).
Präp. No. II.	0,129 / 0,172	Gr.	»	»	—	16,98 %	Stickstoff.
	1,184	Gr.	»	»	—	1,29 %	Schwefel.
	(»	Gr.	»	»	—	0,05 %	Phosphor[3]).
Präp. No. III.	0,235	Gr.	»	»	—	17,09 %	Stickstoff.
	1,447	Gr.	»	»	—	1,27 %	Schwefel.
	(»	Gr.	»	»	—	0,06 %	Phosphor).
Präp. No. IV.	0,181	Gr.	»	»	—	17,01 %	Stickstoff.

Mittelwerth: 17,04 % Stickstoff.
1,27 % Schwefel.

---

[1]) Jeder natürliche Linsenextract hat deutlich alkalische Reaction.

[2]) Dieses Präparat wurde durch directes Eintrocknen (wodurch sich der hohe Aschegehalt erklärt) der Lösung erhalten. Die übrigen Präparate ergaben weniger als 0,5 % Asche.

[3]) In Bezug auf die geringe Phosphormenge siehe Seite 78.

Es sind somit nicht unbedeutende Unterschiede, welche die beiden Globulinsubstanzen der Linse von einander trennen, wesswegen über ihre verschiedene Natur nicht der geringste Zweifel herrschen kann.

Abgesehen von der geringeren Fällbarkeit durch Essigsäure und Kohlensäure und einem etwas höheren Stickstoffgehalt (17,04 % gegen 16,68 %), zeichnet sich das β-Krystallin vor dem α-Krystallin durch einen mehr als doppelt so grossen Schwefelgehalt (1,27 % gegen 0,57 %), wovon ein bedeutender Theil in «lose Bindung» eingeht, sowie durch eine bedeutend niedrigere Coagulationstemperatur (+ 63° gegen + 72° C.), aus.

Ebenso wenig, wie dies mit α-Krystallin der Fall war, liegt hier, so weit ich sehen kann, die Möglichkeit vor, das eben beschriebene β-Krystallin mit einer anderen, früher bekannten Globulinsubstanz zu identificiren, und bin ich vielmehr geneigt, auch im β-Krystallin einen für die Linse specifischen Eiweisskörper zu sehen.

Ausser der beinahe nur spurweise vorkommenden Albuminsubstanz lassen sich also zwei wesentlich ungleichartige Globulinsubstanzen, α- und β-Krystallin, die zusammen den löslichen Eiweissstoff der Linse ausmachen, mit Bestimmtheit nachweisen. Der unlösliche Theil der Linse, das Albumoïd, ist schon früher besprochen worden. Während der Arbeit hat sich keine Veranlassung zu der Annahme eines noch complicirteren Verhältnisses geboten.

In Bezug auf einige frühere Arbeiten von Simon[1]), Lieberkühn[2]) und Béchamp[3]), welche sich bei ihren Versuchen, die Eiweisskörper der Linse zu isoliren, mehr oder weniger verdünnten Alkohols bedienten, will ich erwähnen, dass keiner meiner Versuche über die Einwirkung dieses Mittels auf α- und ϰ-Krystallin die Hoffnung erregte, sie auf diesem Wege trennen zu können.

---

[1]) Loc. cit.
[2]) Loc. cit.
[3]) Loc. cit.



Freilich ist es wahr, dass wenn man z. B. die Linsenmasse mit Alkohol auskocht (Simon), oder wenn man eine mit Alkohol ausgefällte Portion Linseneiweiss mit Wasser extrahirt (Béchamp), ein Theil des Eiweissstoffes sich im Lösungsmittel findet, ein anderer Theil einen unlöslichen Rest bildet, aber deswegen zu glauben, dass sowohl der gelöste wie der ungelöste Theil einen von dem anderen verschiedenen Eiweisskörper ausmacht, hat sich nicht als berechtigt erwiesen.

Bei diesen Versuchen bildet nämlich die Hauptmasse beider Globulinsubstanzen den coagulirten Theil, während das Lösungsmittel einen kleineren Theil sowohl des α- wie des β-Krystallins enthält.

Nachdem wir die verschiedenen Bestandtheile des Linseneiweisses kennen gelernt haben, wollen wir nun sowohl die Mengeverhältnisse der verschiedenen Eiweisskörper in der Linse, als Ganzes betrachtet, in Erwägung ziehen, als auch noch einmal deren wesentlich ungleiche Vertheilung in den inneren und äusseren Schichten der Linse hervorheben.

Die Analyse der wasserfreien Linsenmasse[1]) ergab folgende Werthe:

Präp. No. I.	0,201 Gr.	angew. Substanz	—	16,68 °/₀	Stickstoff.
	1,052 Gr.	» »	—	0,90 °/₀	Schwefel.
Präp. No. II.	0,154 Gr.	» »	—	16,56 °/₀	Stickstoff.
	1,841 Gr.	» »	—	0,88 °/₀	Schwefel.
Präp. No. III.	1,699 Gr.	» »	—	0,92 °/₀	Schwefel.
Präp. No. IV.	1,553 Gr.	» »	—	0,94 °/₀	Schwefel.

Mittelwerth: 16,62 °/₀ Stickstoff.
0,91 °/₀ Schwefel.

Hieroben angeführte Bestimmungen (siehe S. 73) geben an, dass das Totaleiweiss der Linse zu ungefähr 48 °/₀ aus

---

[1]) Aschegehalt 1,10—1,74 °/₀.

unlöslicher Substanz, dem Albumoïd, besteht, übrigens aus *löslichem* Eiweiss gebildet wird.

Obgleich in diesem Falle von geringerer Bedeutung, weil der Unterschied im Schwefelgehalt der beiden Componenten nicht stark ausgeprägt ist, erbietet doch eine Controllrechnung mit Hilfe der bekannten Schwefelwerthe einiges Interesse. Aus die Equation:

$$48 \times 0{,}79 + 52 \times 1{,}01 = 100 \times x$$

geht hervor:

x (Schwefelgehalt des Totaleiweisses) = 0,90 %,

welches gut mit dem direct gefundenen: 0,91 % übereinstimmt.

Zur Bestimmung der Globulinsubstanzen des löslichen Eiweisses sind die Schwefelwerthe ein besonders geeigneter Ausgangspunkt, wobei die Equation:

$$0{,}56 \times x + 1{,}27\,(100 - x) = 1{,}01 \times 100$$

X (die Menge des α-Krystallin) zu 37 % angibt. Die übrigen 63 % werden vom β-Krystallin gebildet, ausser ungefähr 1 %, auf welches ich nach direct ausgeführten Bestimmungen die Menge der Albuminsubstanz schätzen kann (S. 84).

Das lösliche Eiweiss der Linse besteht also ungefähr aus:

37 % — α-Krystallin,
62 % — β-Krystallin,
1 % — Albumin,

und folglich das Totaleiweiss der Linse aus ungefähr:

48 % unlöslichem Albumoïd,
32 % β-Krystallin,
19,5 % α-Krystallin,
0,5 % Albumin.

Wenn man diese Werthe, mit Rücksicht auf die wasserhaltige Linse in natürlichem Zustande, deren Eiweissgehalt nach Berzelius'[1]) und Laptschinsky's[2]) Bestimmungen

---

[1]) Loc. cit.
[2]) Loc. cit.

ungefähr 35 % beträgt, umrechnet, so erhält man für die Menge der verschiedenen Eiweissstoffe in der frischen Linse:

17 % unlösliches Albumoïd,
11 % β-Krystallin,
6,8 % α-Krystallin,
0,2 % Albumin.

In Zusammenhang hiermit dürfte es wohl nicht ohne Interesse sein, den von Laptschinsky herrührenden Angaben eine kurze Kritik zu widmen.

Laptschinsky gibt an, dass die Linse 24,6 % «Globulin» enthält, samt: «ungefähr 11 % eines löslichen Eiweissstoffes», über welchen er weiter sagt: «Dieser Eiweissstoff scheint mit dem Serumalbumin übereinzustimmen».

Wie Laptschinsky diese Werthe, die sich beim ersten Blick auf keine Weise mit den von mir gefundenen vereinigen lassen, erhalten hat, ja wie er bei dem von ihm angewendeten Verfahren dazu kommen musste, ist uns jetzt leicht verständlich. Laptschinsky rieb nämlich die Linsen mit Wasser, leitete (ohne vorhergehendes Filtriren!) Kohlensäure in die Mischung und bestimmte, nach dem Filtriren, die Menge «ausgefällten Globulins» und «Serumalbumins» (im Filtrate).

Das «ausgefällte Globulin» muss indessen, nach dem, was wir oben erfahren haben, aus dem unlöslichen Albumoïd + α-Krystallin gebildet werden und sich nach meinen eben angeführten Werthen auf ungefähr 24 % (= 17 + 6,8) belaufen, welches nahe den von Laptschinsky gefundenen 24,6 % entspricht. Und ebenso deutlich ist es, dass die ganze Menge β-Krystallin in Laptschinsky's Werth für «Serumalbumin» enthalten ist, weswegen auch zwischen demselben und dem von mir gefundenen Werthe für β-Krystallin Uebereinstimmung herrscht (beide ungefähr 11 %).

Den deutlich hervortretenden Unterschied in der Consistenz, der zwischen den äusseren (der Rinde) und den inneren Schichten (dem Kern) der Linse herrscht, hat man seit Alters ganz einfach durch einen ungleichartigen Wassergehalt dieser Theile erklären wollen, indem die Eiweisslösung in den äusseren

Theilen mehr verdünnt als in den inneren sein sollte; dass jedoch die Beschaffenheit des Linseneiweisses selbst eine Rolle dabei spielen könnte, ist niemals auch nur angedeutet worden.

Für diese letztere Möglichkeit muss ich mich dagegen aus wichtigen Gründen aussprechen. Seit es hervorgegangen ist, dass die äusseren Schichten der Linse in verhältnissmässig unbedeutendem Theil, die inneren dagegen in überwiegendem Masse aus einer unlöslichen, histologisch bestimmt geformten Substanz (dem Albumoïd) bestehen, bin ich geneigt, in diesem Verhältnisse das wesentliche Moment für die Verschiedenheit der Consistenz zu sehen, ohne dass ich leugnen will, dass auch der verschiedene Wassergehalt etwas dazu beitragen kann.

In dieser Auffassung werde ich durch einen besonderen Umstand bestärkt.

Da die *äusseren* Linsentheile beim erwachsenen Thiere in Bezug auf ihre Consistenz sehr nahe mit der *ganzen* Linse vom jungen Kalbe übereinstimmen — sie sind beide viel weicher und leichter zusammenzudrücken als der innere Theil der ausgewachsenen Linse —, so untersuchte ich ganze Kalbslinsen auf dieselbe Weise wie oben angeführt, um das Verhältniss zwischen dem unlöslichen Albumoïd und dem löslichen Eiweiss festzustellen. Daraus ging hervor, dass die Kalbslinse im Ganzen 17,6 % unlöslicher Substanz enthielt, was ungefähr die gleiche Menge, oder 16,4 % ist, die aus den äusseren Schichten der ausgewachsenen Linse in einem Versuche erhalten wurde, und dass also ein relativ niedriger Gehalt an unlöslichem Albumoïd und eine weiche Consistenz Hand in Hand gehen.

Ganz summarisch können wir die Vertheilung der verschiedenen Eiweisskörper in der Linsenmasse folgendermassen ausdrücken:

Die Menge an unlöslichem Albumoid nimmt von aussen nach innen zu,

Die Menge von löslichem Eiweiss nimmt von aussen nach innen ab.

Nimmt man nur auf das Verhältniss zwischen den Bestandtheilen des löslichen Eiweisses Rücksicht, so weisen sie folgende Beziehungen auf:

α-Krystallin: nimmt von aussen nach innen ab,
β-Krystallin: nimmt von aussen nach innen zu.
Albumin: zeigt keine bemerkenswerth ungleiche Vertheilung.

Vom genetischen Gesichtspunkte ist die Linse bekanntlich eine epiteliale Bildung, am ehesten mit der Epidermis zu vergleichen, und man sollte deshalb glauben, Keratin in der Linse zu finden. Indessen ist es schon seit lange erwiesen, dass diese Vermuthung keine Bestätigung findet — die Linse enthält nicht Keratin, und nach Knies'[1]) Untersuchung der cataractösen Linse ist dies nicht einmal unter pathologischen Umständen der Fall.

Als dem Keratinisiren der Epidermiszellen entsprechend könnte man den Umstand ansehen, dass die Linsenfasern das von gewöhnlichem Eiweissstoff durch seine Unlöslichkeit resp. Schwerlöslichkeit verschiedene Albumoïd enthalten, welches in Folge dieser Eigenschaften dem Keratin einen Schritt näher kommt; und ganz auffallend ist die Analogie, die zwischen den *jungen* Epidermiszellen und Linsenfasern einerseits, und denselben Bildungen in einem *älteren* Stadium ihrer Entwickelung andererseits herrscht.

Wie die Epidermiszellen mit zunehmendem Alter sich in Keratin umwandeln, indem die jungen Zellen in stratum Malpighii noch kaum eine Spur davon aufweisen, und die ältere in den äussersten Lagen vollständig keratinisirt sind, ebenso nimmt auch der Gehalt der Linsenfasern an unlöslichem Albumoïd mit steigendem Alter zu, so dass die älteren Linsenfasern, die den Kern der Linse bilden, überaus mehr unlösliche Substanz enthalten als die jüngeren Linsenfasern, welche die äusseren Schichten der (ausgewachsenen) Linse oder sämmtliche Linsenschichten des jungen Thieres (Kalbes) bilden.

---

[1]) Zur Chemie der Altersveränderungen der Linse. Untersuchungen aus dem physiologischen Institute der Universität Heidelberg, Bd. 1, S. 114 (1878.)

Möglicherweise ist die senile Cataracte, welche von einigen Ophthalmologen für eine «physiologische Veränderung» angesehen wird, die früher oder später eintreten muss, und der man nur durch einen vorzeitigen Tod entgehen kann, als äusserste Consequenz dieser fortschreitenden Albumoïdwandlung der Linsenfasern aufzufassen, indem die Linse nach Verlust der löslichen Eiweisskörper das Licht nicht mehr in hinreichendem Grade durchzulassen vermag.

Nachträgliche Bemerkungen zu meiner Abhandlung «Zum Nachweis der Harnsäure in den Organen».

Von

Dr. Carl Wulff.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 22. April 1893.)

Im vorigen Hefte dieser Zeitschrift habe ich in meiner Abhandlung «Zum Nachweis der Harnsäure in den Organen» dargelegt, dass man gegen die Resultate der experimentellen Untersuchungen, durch welche Horbaczewski die Bildung von Harnsäure aus dem Nucleïn nachweist, Einwendungen erheben kann, insofern in der Abhandlung Horbaczewski's der Beweis für die Reinheit des von ihm als Harnsäure angesprochenen Isolirungsproductes vermisst wird und man mit der Möglichkeit, ja mit der Wahrscheinlichkeit zu rechnen hat, dass dasselbe z. Th. aus Xanthin bestand.

In dem vor Kurzem erschienenen Hefte des Archivs für Physiologie (herausgegeben von Du Bois-Reymond) kommt nun Horbaczewski, veranlasst durch von Kossel kürzlich hinsichtlich der erhaltenen Versuchsresultate geäusserte Zweifel, auf seine frühere Abhandlung zurück. Er führt nunmehr des Genaueren aus, wie die erhaltene Harnsäure identificirt wurde, und kann es hiernach keinem Zweifel unterliegen, dass das von Horbaczewski erhaltene Product wirklich Harnsäure ist.

Durch die Publikation Horbaczewski's werden meine allgemeinen Deductionen über den Nachweis der Harnsäure

in den Organen in keiner Weise berührt. In meiner Abhandlung wird die Präexistenz vom Xanthin als Component des Nucleins in der Pulpa, bevor diese mit dem Blute digerirt wird, vorausgesetzt und von dieser Voraussetzung aus dargethan, dass nach dem von Horbaczewski eingeschlagenen Verfahren mit der gebildeten Harnsäure zugleich auch das Xanthin theilweise isolirt wird. Nach den Ausführungen von Horbaczewski freilich verschwindet das Xanthin bei genauem Einhalten der Versuchsbedingungen in Folge der Digestion völlig, Horbaczewski sagt aber selbst, dass es schwierig ist, diese Bedingungen genau einzuhalten. Bei geringen Abweichungen von der gegebenen Vorschrift bleiben neben Harnsäure die Nucleinbasen übrig.

Und so erscheint mein Verlangen unabweislich, dass nämlich bei derartigen Versuchen, wie sie Horbaczewski angestellt hat, und besonders bei quantitativen Bestimmungen, wie sie von seinen Schülern ausgeführt sind, in jedem einzelnen Falle die Abwesenheit von Xanthin dargethan wird.

Was die von Horbaczewski angeführten, von ihm nicht auf ihre Schärfe geprüften Methoden betrifft, welche Xanthin neben Harnsäure nachzuweisen gestatten, so habe ich in meiner Abhandlung die Salzsäure-Trennung genügend besprochen. Sie scheint mir kaum mehr als ein Nothbehelf zu sein, für quantitative Bestimmungen dürfte sie auf keinen Fall brauchbar sein. Entgegen den Angaben früherer Autoren konnte ich constatiren, dass das Xanthin sich nur in äusserst geringer Menge in salzsäurehaltigem Wasser löst.

Ob die von Horbaczewski vorgeschlagene Trennung durch Ammoniak hinreichend genaue Resultate liefert, bedarf noch einer besonderen Prüfung.

Zur Frage über den Einfluss einmaliger oder fractionirter Aufnahme der Nahrung auf die Ausnützung derselben.

Von

H. Weiske.

(Der Redaction zugegangen am 24. April 1893.)

Im XVII. Bd., S. 616 dieser Zeitschrift theilt Carl Adrian Versuche mit, bei denen eine Hündin in 3 Versuchsreihen genau das gleiche Futter (Fleisch) erhielt, jedoch mit dem Unterschied, dass in der 1. und 3. Periode die gesammte Tagesration früh 8 Uhr auf einmal, in der 2. dagegen in 4 gleich grossen Einzelportionen, und zwar Morgens 7 und 11, Nachmittags 3 und 7 Uhr, verabreicht wurde. Hierbei ergab sich, dass trotz ganz gleicher Nahrungsaufnahme in der 1. und 3. Periode durchschnittlich pro Tag weniger Stickstoff, resp. Harnstoff im Harn des Versuchsthieres zur Ausscheidung gelangte als in der 2. Periode, woraus geschlossen wird, dass von einer gleichen täglichen Fleischration bei Verabreichung in 4 auf den Tag vertheilten Fractionen ein grösserer Theil des Eiweisses als solches zur Resorption gelangt, als wenn das Ganze auf einmal gegeben wird.

Gleichzeitig ergab sich für die 2. Periode auch eine Vermehrung des Körpergewichtes der Hündin, doch sind Analysen des N-Gehaltes etc. in Fleich und Koth von C. Adrian bei diesen Versuchen aus Mangel an Zeit nicht ausgeführt worden, so dass ein directer Nachweis eines etwaigen Fleischansatzes, resp. der Ausnützung der Nahrung in den einzelnen Versuchs-

perioden nicht möglich war; immerhin ist indess anzunehmen, dass in der 2. Periode die Nahrung besser und vollständiger verdaut wurde als in der 1. und 3.

Im Anschluss hieran sei darauf hingewiesen, dass von mir gleichfalls Versuche über die Ausnützung gleicher Quantitäten ein und desselben Futters je nach Verabreichung desselben in einer oder in mehreren Portionen, und zwar mit Herbivoren, angestellt worden sind[1]), wobei sich aus der Analyse der Nahrung und des Kothes als Resultat ergab, dass ein Hammel sein aus Heu und Hafer bestehendes Futterquantum, je nachdem man dasselbe auf einmal oder in 4 Portionen verabreichte, folgendermaassen verdaute:

Verabreichung des Futters.	Eiweiss.	Fett.	Cellulose.	N-fr. Extractstoffe.
In 1 Portion . .	58,12 %	78,26 %	36,06 %	77,97 %
In 4 Portionen .	62,20	82,40	33,80	76,34
Differenz	+4,08	+4,14	—2,26	—1,63

Die Ausnützung ein und derselben Nahrung war demnach bei Verabreichung derselben in 4 Portionen bezüglich der Eiweissstoffe und des Fettes eine bessere als bei sofortiger Aufnahme in einer Portion, wogegen sich bezüglich der Cellulose und der N-fr. Extractstoffe ein gleicher Einfluss nicht bemerkbar machte. Als Erklärung für die bessere Ausnützung des Eiweisses und des Fettes wurde hierbei angenommen, «dass bei Aufnahme des Futters in kleinen Portionen die Verdauungssäfte besser und intensiver auf die betreffenden Nahrungsstoffe einzuwirken vermögen».

Ausserdem sind von mir Fütterungsversuche mit Kaninchen ausgeführt worden, bei denen ich die Ausnützung ein und desselben Futters (Hafer) je nach seiner Verabreichung in grossen, mittleren oder kleinen Quantitäten ermittelte[2]), wobei sich u. A. folgende Resultate ergaben.

---

[1]) Journal f. Landwirthschaft, Bd. XXXII, S. 337.

[2]) Landw. Versuchs-Stationen, Bd. XLI, S. 145.

Es wurden durchschnittlich verdaut bei:

Tägl. Aufnahme von	Eiweiss.	Fett.	Cellulose.	N-fr. Extractstoffe.
93,5 gr. tr. Hafer	66,8 %	93,6 %	19,6 %	67,9 %
84,5 » » »	81,3	94,7	10,4	84,2
52,0 » » »	92,6	93,1	34,7	86,5

Es stand also auch hier bezüglich des Eiweisses die Grösse der gefundenen Verdauungscoëfficienten im umgekehrten Verhältniss zur Menge des aufgenommenen Futters.

Breslau, im April 1893.

Ueber das Verhalten einiger Pyridin- und Naphthalinderivate im thierischen Stoffwechsel.

Von

Dr. Rudolf Cohn, Privatdocent.

(Aus dem Laboratorium für Pharmakologie und medicinische Chemie zu Königsberg i. Pr.)
(Der Redaction zugegangen am 12. Mai 1893.)

Das Verhalten ringförmiger Körper im thierischen Organismus ist wegen gewisser Eigenthümlichkeiten, die dieselben dabei zeigen, vielfach Gegenstand von Untersuchungen geworden. Bekanntlich sind sie dadurch ausgezeichnet, dass einerseits der Ring als solcher den oxydirenden oder andern Einwirkungen des Thierkörpers einen sehr grossen Widerstand entgegensetzt, andererseits sie besonders leicht sich mit gewissen intermediären Stoffwechselproducten paaren und als gepaarte Verbindungen den Organismus durch den Urin verlassen. Bis vor kurzer Zeit hat man sich nun fast vollständig darauf beschränkt, Abkömmlinge des Benzols, des Hauptrepräsentanten der ringförmigen Körper, auf die Fähigkeit hin zu untersuchen, gepaarte Verbindungen im Thierkörper zu bilden, während aus andern Gruppen ringförmiger Körper nur erst wenige solcher Beispiele bekannt sind. Im Jahre 1887 erschienen 2 Arbeiten, welche unsere Kenntnisse nach der Richtung erweiterten, die eine von His[1]) aus dem Schmiedeberg'schen Laboratorium, die andere von Jaffe und mir[2]). Auf die

[1]) W. His: Ueber das Stoffwechselproduct des Pyridins. Archiv f. experiment. Patholog. u. Pharmakolog., Bd. XXII.

[2]) M. Jaffe u. Rud. Cohn: Ueber das Verhalten des Furfurols im thierischen Organismus. Berl. Ber., Bd. XX, S. 2311.

His'sche Arbeit komme ich alsbald zu sprechen, ich will zunächst nur kurz die Resultate unsrer Arbeit erwähnen.

Wir wählten zu unsern Untersuchungen das Furfurol, den Aldehyd der Brenzschleimsäure, einen Körper, der sich bekanntlich von dem Furfuranring ableitet, der aus 4 CH-Gruppen und einem O besteht mit abwechselnd doppelter und einfacher Bindung der C-Atome.

$$\begin{array}{l} CH = CH \\ | \qquad\quad > O = \text{Furfuran}, \\ CH = CH \end{array}$$

$$\begin{array}{l} CH = CH \\ | \qquad\quad > O = \text{Furfurol}. \\ CH = C.COH \end{array}$$

Dasselbe paart sich bei Säugethieren nach seiner Oxydation zu Brenzschleimsäure mit Glycocoll zu einer hippursäureartigen Verbindung, der von uns sogenannten Pyromycursäure, während es bei Vögeln nach späteren Untersuchungen[1]) sich mit Ornithin zur Furfurornithursäure verbindet, es verhält sich also ganz analog der Benzoësäure. Abgesehen davon lieferte es bei Säugethieren als Nebenproduct noch eine sehr interessante Verbindung, die Furfuracrylsäure, die ebenfalls mit Glycocoll gepaart als Furfuracrylursäure ausgeschieden wurde. Auch noch ein andrer Repräsentant dieser Gruppe, die α-Thiophensäure,

$$\begin{array}{l} CH = CH \\ | \qquad\quad > S, \\ CH = C.COOH \end{array}$$

lieferte nach Untersuchungen von H. Levy[2]) eine Glycocollverbindung, die α-Thiophenursäure, während ein dritter analoger Körper, die Pyrrolcarbonsäure,

$$\begin{array}{l} CH = CH \\ | \qquad\quad > NH, \\ CH = C.COOH \end{array}$$

nach J. Ginzberg ungepaart den Thierkörper verlässt[3]).

[1]) M. Jaffe u. Rud. Cohn: Ueber das Verhalten des Furfurols im Stoffwechsel der Hühner. Berl. Ber., Bd. XXI, S. 3461.

[2]) H. Levy: Ueber das Verhalten einiger Thiophenderivate etc. Dissert. inaug., Königsberg, 1889, und M. Jaffe u. H. Levy: Ueber die Glycocollverbindung der α-Thiophensäure etc. Berl. Ber., Bd. XXI, S. 3458.

[3]) J. Ginzberg: Ueber das Verhalten des Pyrrols und einiger seiner Derivate im thierischen Organismus. Dissert. inaugural., Königsberg, 1890.

Zu einem höchst merkwürdigen Ergebniss führte die Arbeit von His: «Ueber das Stoffwechselproduct des Pyridins», eines Ringes von der Zusammensetzung

$$\begin{array}{ccc} & CH & \\ HC & & CH \\ HC & & CH \\ & N & \end{array}$$

His fand im Urin eines mit Pyridin gefütterten Hundes nicht, wie er nach Analogie mit dem Benzol vermuthete, eine gepaarte Schwefelsäure- oder Glycuronsäureverbindung eines aus dem Pyridin durch Oxydation entstandenen Oxypyridins, sondern eine Base, die er als Methyl-Pyridylammoniumhydroxyd ansprach: $C_5H_5N \langle {CH_3 \atop OH}$. Es hat demnach eine Synthese mit Methyl stattgefunden, ein Vorgang, der vollständig ohne Analogie dasteht und so merkwürdig ist, dass His zunächst nach einer anderen Quelle für den Befund suchte, dieselbe aber glaubte ausschliessen zu können, da er erstens reines Pyridin verfütterte, und auch nach einer zweiten Darstellungsmethode, bei der eine nachträgliche Anlagerung der CH_3-Gruppe bei den zur Gewinnung der Base unternommenen Manipulationen sicher nicht stattfinden konnte, dieselbe Verbindung erhalten wurde.

Bisher hat eine Nachprüfung der His'schen Entdeckung, so viel mir bekannt, nicht stattgefunden. Wenngleich zwar die Ausführung der Arbeit eine äusserst exacte ist, so war in ihr doch noch nicht der vollständig strikte Beweis geführt, dass erstens diese Base vorlag und zweitens absolut chemisch reines Pyridin verfüttert war. Was zunächst letzteren Punkt anlangt, so musste allerdings His sein Pyridin für rein halten, denn die Arbeit von Ladenburg[1]), die es ermöglicht, absolut reines Pyridin darzustellen, erschien erst ein Jahr nach der His'schen Arbeit.

[1]) Annalen der Chemie, Bd. 247, S. 1.

His gibt an, dass das von ihm verwandte Pyridin bei 115—116° destillirte, während nach Ladenburg der Siedepunkt bei 114° liegt; ist die Differenz auch sehr gering, so darf sie doch nicht ganz vernachlässigt werden.

Wesentlich wichtiger ist jedoch ein zweites Bedenken. His hat nicht die freie Base analysirt, sondern ein Platin- und Golddoppelsalz derselben, und stimmten auch die Analysen der Salze genau für die angenommene Formel, so ergaben sie doch natürlich keinen Anhaltspunkt für die Constitution der supponirten Verbindung. Von der aus dem salzsauren Salz freigemachten Base beschreibt er nur die Eigenschaften. Er äussert sich darüber folgendermaassen:

«Die Base selbst wurde aus dem salzsauren Salze durch «Zersetzen mit Silberoxyd befreit: die wässerige Lösung, vom «Chlorsilber abfiltrirt, concentrirt sich bei vorsichtigem Ein«engen zu einer farblosen, geruchlosen, nicht flüchtigen Flüssig«keit von stark alkalischer Reaction; weiteres Eindampfen «jedoch zersetzt dieselbe, anfangs unter Bräunung, später «unter vollständiger Schwärzung, Abscheidung brauner Flocken «und Entwicklung eines intensiven humusartigen Geruches.

«Weit leichter noch tritt die Zersetzung ein in Gegen«wart von Alkalien unter denselben Erscheinungen, wie sie «soeben von der freien Base beschrieben wurden. Wenn «schon die Nichtflüchtigkeit dieser Base dieselbe als Ammonium«base erscheinen lässt, so entspricht die leichte Zersetzbarkeit «durch Wärme, durch Alkalien und das Auftreten jener eigen«thümlich riechenden, flüchtigen Substanzen bei der Zersetzung «vollständig der Beschreibung, die Hofmann von den Pyridyl«Ammoniumbasen gegeben hat[1]).

«Wir haben daher, mit Berücksichtigung der gefundenen «Formel, diese Base als Methyl-Pyridylammoniumhydroxyd «anzusprechen: $OH . CH_3 . N . C_5H_5$, und das salzsaure Salz «als Methyl-Pyridylammoniumchlorid: $Cl . CH_3 — N . C_5H_5 =$ «C_6H_8NCl».

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XIV, S. 1498.

His hat also wohl die Constitution der Base sehr wahrscheinlich gemacht, einen zwingenden Beweis dafür aber durchaus nicht erbracht.

Die angeführte Synthese ist nun eine so interessante, dass es sich sehr wohl verlohnte, schon allein zur Bestätigung die Versuche zu wiederholen. Dann aber stellte ich mir die Aufgabe, sie erstens mit absolut reinem, nach der Ladenburg'schen Methode dargestellten Pyridin auszuführen und zweitens die Base, resp. ihr Platinsalz auf künstlichem Wege darzustellen, um die Eigenschaften desselben mit dem eventuell aus dem Harn nach Pyridindarreichung erhaltenen vergleichen zu können.

Zunächst stellte ich mir also reines Pyridin dar. Von Kahlbaum bezogenes Pyridin wurde destillirt und 50 gr. der Fraction 115°—116° nach der Ladenburg'schen Vorschrift in das Hg-Salz verwandelt; dasselbe sinterte schon bei 172° zusammen, schmolz bei 177°, ebenso nach zweimaligem Umkrystallisiren. Der Schmelzpunkt soll bei 177—178° liegen. Das Hg-Salz wurde darauf mit Natronlauge destillirt, aus dem Destillat das Pyridin durch NaOH abgeschieden und 3 Tage über festem Aetznatron getrocknet, darauf filtrirt und destillirt. Die ersten Tropfen gingen bei 113,5° über, alles andre bis auf den letzten Tropfen bei 114—115°. Danach war es jedenfalls als reines Pyridin anzusehen und wurde zu einem Fütterungsversuche an einem 15 Kilo schweren Hunde benutzt.

Der Hund erhielt Abends 1 gr. Pyridin in 5procentiger essigsaurer Lösung mittelst Schlundsonde in den Magen gegossen, es wurden dann noch 200 cbcm. Wasser nachgespült. Erbrechen trat nicht ein. Der bis zum nächsten Mittag entleerte Urin wurde mit NH_3 und Bleiessig ausgefällt, das Filtrat mit Schwefelsäure entbleit und das Filtrat vom schwefelsauren Blei mit einer Lösung von Jodquecksilberkalium gefällt; es entstand ein dickflockiger, sehr bald krystallinisch werdender schwefelgelber Niederschlag, der nach 24 Stunden abfiltrirt und gründlich ausgewaschen wurde; er wog exsiccatortrocken ca. 1 gr. Die Fütterung wurde in derselben Weise noch

3 Tage fortgesetzt, am letzten Tage erhielt der Hund 2 gr. Pyridin; aus den entsprechenden Urinen wurden erhalten 2 gr., 1,7 gr., 1,7 gr., und aus dem am 2. Tage nach Aufhören der Fütterung erhaltenen Urin noch 3,1 gr. gewonnen. Ich hatte also 5 gr. Pyridin verfüttert und 9,5 gr. des Niederschlages erhalten, der wohl zum grössten Theil aus Jodblei bestand.

Der Niederschlag wurde nun genau nach der His'schen Vorschrift weiterverarbeitet; er wurde mit verd. H_2SO_4 und frisch gefälltem Ag_2O zersetzt, das Filtrat mit Barytwasser gefällt, filtrirt, CO_2 durchgeleitet, aufgekocht, das Filtrat mit HCl genau neutralisirt und eingedampft. Es hinterblieb ein fast farbloser Syrup, der mit Alkohol abs. versetzt wurde; von den alsbald ausgeschiedenen Krystallen wird abfiltrirt, das Filtrat abgedampft, der Rückstand wiederum mit Alkohol abs. aufgenommen, dieselbe Operation nochmals wiederholt und schliesslich die filtrirte alkoholische Lösung mit Platinchlorid versetzt. Es scheidet sich ein gelbgefärbter Niederschlag aus, der mikroskopisch nicht deutlich krystallinisch ist. Bis zum nächsten Tage haben sich noch farblose Krystalle in geringer Menge daneben ausgeschieden. Der Niederschlag wird abfiltrirt, mit Alkohol und Aether gewaschen, wiegt trocken 0,45 gr. Er wird aus heissem Wasser umkrystallisirt, in dem er sich ziemlich leicht und vollständig klar löst, nach dem Abkühlen scheiden sich orangeroth gefärbte, breite, rhombische Tafeln aus; sie werden nochmals aus heissem Wasser umkrystallisirt, zeigen das gleiche Aussehen. Sie schmolzen zuerst bei 200° unter Gasentwickelung, nach dem zweiten Umkrystalliren bei 211°. Zuletzt erhielt ich 0,25 gr., von denen eine Platinbestimmung gemacht wurde.

0,2027 gr. (bei 100—105° getrocknet, waren wasserfrei), gaben 0,0663 Pt = 32,7 %,
verl. Pt = 32,67 %.

Es unterlag somit keinem Zweifel, dass die von mir erhaltene Verbindung identisch war mit der von His dargestellten, ich ging daher nun daran, zum Vergleich die supponirte Base künstlich darzustellen, was ohne grosse Schwierig-

keiten nach den Angaben von Lange[1]) möglich ist. Ich liess 10 gr. frisch destillirtes Jodmethyl auf 5 gr. reines Pyridin einwirken; die Reaction verlief durchaus nicht so heftig, wie Lange angibt, nur gegen den Schluss trat Erwärmung und schwaches Sieden ein. Der gebildete feste Körper wurde in Wasser gelöst, vom überschüssigen Jodmethyl abfiltrirt, mit frisch gefälltem Chlorsilber im Ueberschuss geschüttelt, das Filtrat mit Platinchlorid gefällt. Das Platinsalz schied sich sogleich krystallinisch aus und wurde aus wenig Wasser umkrystallisirt. Es schieden sich bei langsamem Abkühlen breite, orangerothe Tafeln aus, die genau das Aussehen der aus dem Urin nach Pyridinfütterung erhaltenen Krystalle hatten, sich in heissem Wasser ebenfalls leicht lösten und beim Abkühlen in derselben Weise auskrystallisirten. Sie schmolzen nach dem Umkrystallisiren ebenfalls bei 210—211° unter Gasentwickelung, während Lange 202—203° angibt.

Es ist nach Allem an der Identität beider Substanzen nicht zu zweifeln, und da die künstlich dargestellte die Constitution der Methyl-Pyridylammoniumbase besitzt, muss sie auch für den aus dem Urin gewonnenen Körper gelten und daher in der That der Beweis für die merkwürdige Synthese als erbracht angesehen werden.

Ich habe also die His'sche Beobachtung in vollstem Umfange bestätigen können.

Ich ging nun dazu über, ein Pyridinderivat auf sein Verhalten im Organismus zu prüfen, welches eine Seitenkette besitzt und zwar wollte ich zunächst den Pyridinaldehyd verfüttern, um zu erfahren, ob derselbe ein ähnliches Verhalten wie der Benzaldehyd zeigen würde. Pyridinaldehyd ist noch nicht bekannt, ich machte daher den Versuch, ihn, und zwar die α-Verbindung, durch Einwirkung von Chromylchlorid auf α-Picolin in einer Lösung von CS_2 darzustellen[2]) Ich löste zu dem Zwecke 18 gr. reines α-Picolin, das ich nach der Ladenburg'schen Methode gewonnen hatte und das den Siedepunkt 129—130° zeigte, in 90 gr. CS_2 und setzte ca. 40 gr.

---

[1]) Berl. Ber., Bd. XVIII, S. 3438.
[2]) Berl. Ber., Bd. XIX, S. 1061.

Chromylchlorid in kleinen Portionen langsam zu. Es findet dabei starke Erwärmung statt, am Anfang öfters explosionsartiges Stossen. Die Masse wurde bald harzig fest und blieb 3×24 Std. stehen, gab nach dem Uebergiessen mit Wasser einen schmierigen Brei, aus dem es mir nicht gelang, den Pyridinaldehyd zu gewinnen.

Ich verwendete daher zu meinen Versuchen das α-Picolin selbst, in der Erwartung, dass der Thierkörper schon die Oxydation der Methylgruppe selbst besorgen würde. Fütterung mit Picolin beim Hunde hat schon His in der oben erwähnten Arbeit unternommen, sie verlief ergebnisslos, denn es gelang ihm nicht, eine der nach Pyridinfütterung auftretenden Base ähnliche Verbindung zu isoliren. Nach anderer Richtung hat er den Urin nicht untersucht, überhaupt fehlen nähere Angaben über den Versuch.

Ich gab das reine, unverdünnte α-Picolin 3 Kaninchen subcutan. Sie vertrugen es eine Woche lang in täglichen Dosen von 0,5—1,0 gr., dann zeigten sich erst Vergiftungserscheinungen, der Urin enthielt Eiweiss und Cylinder und zwar wenig hyaline und viel granulirte, z. Th. mit Epithelien bedeckte. Ein kleines Kaninchen bekam Krämpfe und starb, ein zweites bekam ebenfalls Krämpfe, erholte sich aber wieder, und das dritte blieb frei von Vergiftungserscheinungen. Im Ganzen erhielten die Kaninchen zusammen 12 gr. α-Picolin. Der einige Stunden nach der Injection abgedrückte Urin zeigte regelmässig deutlichen Geruch nach Picolin, es wird also jedenfalls ein Theil desselben unverändert ausgeschieden, wie gross derselbe ist, entzieht sich der Berechnung. Der am nächsten Tage entleerte Urin zeigte den Geruch nach Picolin nicht mehr.

Die Verarbeitung der Urine geschah in folgender Weise: sie wurden immer frisch zur Trockne eingedampft, mit kochendem Alkohol 3 Mal extrahirt, die vereinigten Auszüge nach dem Klären filtrirt und abgedampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst, zunächst mit verdünnter Essigsäure angesäuert und 4 Mal mit erneuten grossen Portionen Aether extrahirt. Nach dem Abdestilliren desselben blieb ein dunkelgefärbter Rückstand, der nach völligem Verdunsten des Aethers an der

Luft zunächst nicht krystallinisch wurde; erst nach wochenlangem Stehen unter dem Exsiccator schied sich etwa 1 gr. der später zu beschreibenden Verbindung aus dem Oele ab. Ich versetzte nun die essigsaure, schon 4 Mal mit Aether extrahirte Lösung mit verdünnter Schwefelsäure und schüttelte nochmals 4 Mal mit grossen Aethermengen aus. Die jetzt nur sehr wenig gefärbten Auszüge wurden auf etwa 50 cbcm. abdestillirt. Es schieden sich, zum Theil schon während des Destillirens, nach mehrstündigem Stehen in grösserer Menge Krystalle ab, die nach dem Abfiltriren und gründlichen Auswaschen mit Aether fast farblos sind und trocken 4 gr. wiegen. Aus der Mutterlauge erhielt ich bei weiterem Concentriren noch 0,6 gr. derselben Verbindung, ebenso nach dem Absaugen des letzten Aetherrückstandes auf einer Thonplatte noch eine geringe Menge, sodass die Ausbeute mit Hinzurechnung der aus essigsaurer Lösung gewonnenen ca. 6 gr. betrug.

Die Substanz zeigte folgende Eigenschaften: sie löst sich schwer in Aether und kaltem Wasser, leicht in kochendem Wasser, aus dem sie nach Behandlung mit Thierkohle in farblosen, dicken, prismatischen, hippursäureähnlichen Krystallen sich ausscheidet, aus sehr verdünnter Lösung in farblosen, rhombischen Tafeln von fast 1 cm. Seitenlänge. Die Lösungen zeigten die Eigenthümlichkeit, beim Kochen mit Thierkohle ein citronengelbes Filtrat zu liefern.

Die Krystalle schmelzen unter Gasentwickelung bei 164—165°, sublimiren nicht.

Die Vermuthung, dass es sich um eine Glycocollverbindung der α-Pyridincarbonsäure, die ich α-Pyridinursäure nennen möchte, handelt, wurde durch folgende Versuche zur Gewissheit:

Zunächst machte ich eine N-Bestimmung nach Dumas.

0,1774 gr. (die Substanz ist wasserfrei) gab N = 22,8 cbcm. bei t = 10,5° und Ba = 762 mm.

N = 0,02731896 = 15,4 %.

Pyridinursäure ($C_8 H_8 N_2 O_3$) verl. N = 15,5 %.

Eine N-Bestimmung nach Kjeldahl ergab 6,3 % N zu wenig; einen Grund dafür kann ich nicht angeben.

Von Salzen stellte ich ein Silber- und Barytsalz dar.

Ag-Salz.

Dasselbe wurde aus einem Theil der reineren Mutterlaugen durch vorsichtige Neutralisirung mit NH_3, Eindampfen auf geringes Volumen und Fällung mit $AgNO_3$ gewonnen. Es schieden sich lange, feine Nadeln ab, die sich rosettenförmig lagern; aus verdünnterer Lösung beim langsamen Ausscheiden sehr viel längere, breite, dünne Nadeln.

0,1438 gr. (bei 100—105° getr.) gab 0,0542 Ag = 37,5 %.
$C_8H_7AgN_2O_3$ verl. Ag = 37,6 %.

Ba-Salz.

Ein andrer Theil der Mutterlaugen wird mit $BaCO_3$ neutralisirt, das Filtrat auf wenige cbcm. eingedampft; es erstarrt nach dem Abkühlen zu einem Krystallbrei, der auf einer Thonplatte abgesogen farblose, sich etwas fettig anfühlende Blättchen zurücklässt, die nochmals aus Wasser umkrystallisirt werden. Sie lösen sich in wenig heissem Wasser sehr leicht, scheiden sich in farblosen, silberglänzenden Blättchen aus. Das Filtrat davon wird mit Alkohol und Aether gefällt, es scheiden sich mikroskopisch kleine sechseckige, dünne Blättchen aus.

0,3980 gr. des lufttrockenen Salzes, das 24 Stunden frei gelegen hatte, gab, bei 105° getrocknet, 0,3668; Verlust = 0,0312 H_2O = 7,8 %,
0,3668 gab 0,1707 $BaSO_4$ = 0,10035 Ba,
Ba = 27,4 % (des wasserfreien Salzes).
$(C_8H_7N_2O_3)_2Ba + 2H_2O$ verl.: H_2O = 6,9 %; Ba (des wasserfreien Salzes) = 27,7 %.

Hierauf machte ich einen Spaltungsversuch der α-Pyridinursäure, indem ich 1 gr. der reinen Substanz 4 Stunden mit heissgesättigtem Barytwasser am Rückflusskühler kochte; die erhaltene Masse wurde in viel Wasser gelöst, der überschüssige Baryt durch CO_2 entfernt, das Filtrat auf etwa 30 cbcm. eingedampft, der gebundene Baryt durch sehr verdünnte H_2SO_4 genau ausgefällt und das Filtrat zur Trockne verdampft. Der fast farblose Rückstand wiegt 0,9 gr.; das

geringe Minus erklärt sich durch Entnahme einiger Proben, unvermeidliche Verluste beim Auswaschen etc. In einem vorher angestellten Spaltungsversuche hatte ich nach Entfernung des überschüssigen Baryts die erhaltene eingeengte Lösung mit H_2SO_4 angesäuert und mit Aether extrahirt, es ging jedoch in den Aether nur ein sehr geringer Theil der abgespaltenen α-Pyridincarbonsäure übcr, da sie in Aether sehr schwer löslich ist; sie sublimirte vollständig. Aus dem dann gewonnenen Gemenge von Glycocoll und α-Pyridincarbonsäure konnte ich letztere nicht in analysenreinem Zustande darstellen.

Ich verfuhr daher diesmal in der Weise, dass ich die 0,9 gr., d. h. das Gemenge der Spaltungsproducte, 3 Mal mit Alkohol absol. gründlich verrieb, dabei ging ein Theil in Lösung, ein andrer blieb ungelöst. Der letztere war farblos, wog 0,3 gr., schmeckte süss, löste sich äusserst leicht in kaltem Wasser und wurde daraus durch Alkohol fast vollständig wieder ausgefällt; dieselbe Prozedur wurde nochmals wiederholt. Ich erhielt 0,27 gr. farbloser Krystalle, die bei 235—236° unter starker Dunkelfärbung schmolzen und CuO mit dunkelblauer Farbe lösten. Dass es sich um Glycocoll handelte, wurde schliesslich noch durch eine N-Bestimmung bestätigt.

0,1711 gr. gab N = 26,8 cbcm. bei t = 11° und Ba = 767 mm.
N = 0,03225648 = 18,8 %. N verl. = 18,7 %.

Der in die alkoholische Lösung übergegangene Antheil des Spaltungsproductes wurde durch Abdampfen wiedergewonnen, es blieb ein syrupöser, bald krystallinisch erstarrender Rückstand, der 0,5 gr. wog und intensiv bitter schmeckte. Die α-Pyridincarbonsäure daraus in ganz analysenreinem Zustande darzustellen, gab ich nach den beim ersten Spaltungsversuch gemachten Erfahrungen auf, ich beschränkte mich darauf, ein Barytsalz zu machen. Die Säure wurde in Barytwasser gelöst, CO_2 durchgeleitet, nach dem Aufkochen filtrirt, das neutrale Filtrat auf ca. 5 cbcm. eingedampft. Es scheiden sich reichlich Krystalle aus, die sich sehr schwer wieder in kochendem Wasser auflösen. Die Lösung wird heiss filtrirt und nochmals auf geringes Volumen eingedampft.

Das Barytsalz scheidet sich in krystallinischen Krusten aus, die aus dicken, z. Th. sargdeckelähnlichen Platten bestehen. Das 24 Stunden an der Luft gelegene Salz verlor bei 105° nur 0,83 % H_2O, ist also krystallwasserfrei.

0,2152 gr. gab 0,1307 Ba SO_4 = 0,07685 Ba = 35,7 %.
Pyridincarbonsaurer Baryt $(C_5H_4N.COO)_2Ba$, verl. Ba = 35,9 %.

Es ist also zweifellos, dass wir es in dem Umwandlungsproduct des α-Picolins mit α-Pyridinursäure, d. h. der Glycocollverbindung der α-Pyridincarbonsäure, zu thun haben.

Einem grossen Hunde gab ich ebenfalls α-Picolin subcutan, am ersten Tage 2,4 gr., am zweiten 3,6 gr. in einmaliger Dosis. Nach der zweiten Injection bekam der Hund Erbrechen und an den Injectionsstellen bildeten sich nach einigen Tagen grosse Abscesse. Ein Umwandlungsproduct des α-Picolins konnte ich aus dem Urin, den ich ebenso wie den Kaninchenurin verarbeitete, nicht wiedergewinnen.

Das Verhalten von β- und γ-Picolin habe ich bisher noch nicht prüfen können.

Der nächste Ring, den ich auf seine Fähigkeit, Synthesen im Thierkörper einzugehen, einer Untersuchung unterzog, war der Naphthalinring. Ich wählte zu dem Zwecke wiederum ein Derivat mit einer Seitenkette und zwar erschienen mir sehr geeignet die Naphthoësäuren, die in den beiden Isomeren α und β existiren und in reinem Zustande von Kahlbaum bezogen werden konnten. Einen Versuch mit Verabreichung von Naphthalincarbonsäure hat schon Nencki angestellt[1]). Er nahm davon 1,5 gr. innerlich, ohne irgend eine Störung zu beobachten, und erhielt die Säure aus dem Harne unverändert wieder. Ich bin bei Thieren zu abweichenden Ergebnissen gelangt, die ich in Folgendem schildern will.

[1]) Reichert und Du Bois-Reymond's Archiv, 1870, citirt nach Nencki und Boutmy: Ueber den Einfluss der Carboxylgruppe auf die toxische Wirkung aromatischer Substanzen. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., Bd. XXX, S. 302.

I. Versuche bei Kaninchen.

1. α-Naphthoësäure (Schmelzpunkt 161°).

9 gr. derselben wurden zunächst mittelst Na_2CO_3 in 50 cbcm. Wasser gelöst und davon einem Kaninchen 3 Pravaz'sche Spritzen = 0,6 gr. Naphthoësäure subcutan injicirt. Da es sehr schmerzhaft zu sein schien, wurde es von nun an an 2 Kaninchen innerlich verabreicht und zwar in täglich einmaliger Dosis von 1 gr. in 25 cbcm. Wasser gelöst. Die Kaninchen vertrugen es gut, der Urin zeigte nur manchmal etwas Eiweiss, enthielt niemals Cylinder, dagegen in vereinzelten Fällen ausgelaugte rothe Blutkörperchen; er reducirte mässig, drehte die Polarisationsebene nicht deutlich. Die vereinigten alkoholischen Auszüge der frisch eingedampften Urine wurden nach dem Abdestilliren in wenig Wasser gelöst und mit verdünnter Schwefelsäure versetzt. Die reichlich ausgeschiedenen Krystalle werden mit Aether ausgeschüttelt, in dem sie sich sehr leicht lösen, die Auszüge zunächst auf 100 cbcm. abdestillirt. Da sich Nichts ausschied, wird der Aether ganz verdunstet, der Rückstand mehrere Tage im luftverdünnten Exsiccator über Schwefelsäure und Paraffin stehen gelassen; er ist noch etwas harzig und wiegt 9 gr., sublimirt vollständig. Ein kleiner Theil davon wird aus kochendem Wasser unter Entfärbung mit Thierkohle umkrystallisirt, es scheiden sich silberglänzende Blättchen aus, die vollständig sublimiren und bei 160° schmelzen. Es wird daraus ein Silbersalz durch Fällung des Ammoniaksalzes mittelst $AgNO_3$ gemacht. Der zunächst amorphe Niederschlag bildet nach dem Umkrystallisiren ein Gemenge amorpher Massen mit kugelförmig angeordneten Nadelgruppen. Das Silbersalz ist leichter löslich, als die Säure selbst, die nach dem Ansäuern der Mutterlauge noch reichlich ausfällt.

0,0336 gr. gaben 0,0129 Ag = 38,4 %.
Naphthoësaures Ag verlangt Ag = 38,7 %.

Die α-Naphthoësäure wird also unverändert ausgeschieden.

2. β-Naphthoësäure (Schmelzpunkt 182°).

Dieselbe wurde in Form des Natriumsalzes in viel Wasser gelöst in der Gesammtquantität von 6 gr. Kaninchen innerlich in Dosen zu 1 gr. 1 Mal täglich verabreicht. Der Urin zeigte bis auf einen geringen Eiweissgehalt, dessen Reactionen durch das beim Ansäuern mit ausfallende Umwandlungsproduct der β-Naphthoësäure in eigenthümlicher Weise beeinflusst wurden, nichts Besonderes. Die Verarbeitung der Urine geschah in der oben beschriebenen Art. Es gelingt zwar, das Umwandlungsproduct schon durch blosses Ansäuern des frischen Urines in reichlichen Mengen zu gewinnen, indessen ist es dann schwieriger zu reinigen, sodass ich bei der sonst von mir geübten Methode blieb. Beim Ansäuern der in Wasser gelösten Rückstände der alkoholischen Auszüge schied sich ein dicker Krystallbrei aus, von dem beim Ausschütteln mit Aether ein Theil sehr leicht, ein anderer etwas schwerer in dieses Lösungsmittel überzugehen schien. Die ätherischen Auszüge wurden zunächst auf 100 cbcm. abdestillirt. Es scheiden sich Krystalle ab, die nach gründlichem Auswaschen mit Aether lufttrocken 2,2 gr. wiegen; bei weiterem Einengen des Aethers scheiden sich noch 0,4 gr. derselben Substanz ab. Der davon abgegossene Aether wird ganz verdunsten gelassen, der Rückstand wird krystallinisch, wiegt noch mit etwas Harz vermengt 3 gr. Letztere erwiesen sich als unveränderte β-Naphthoësäure.

Die zuerst aus dem Aether erhaltenen 2,6 gr., welche das in Nachstehendem zu beschreibende Umwandlungsproduct der β-Naphthoësäure bildeten, zeigten folgende Eigenschaften:

Sie lösen sich schwer in kochendem Wasser und scheiden sich daraus fast vollständig in über zolllangen, äusserst feinen, biegsamen, seideglänzenden, farblosen Nadeln ab, die nach mehrmaligem Umkrystallisiren constant bei 169—170° schmelzen; sie geben nur ein geringes Sublimat und sind N-haltig.

Zunächst machte ich einen Spaltungsversuch, bei dem die Substanz quantitativ in β-Naphthoësäure und Glycocoll zerfiel. Es wurde 1 gr. mit heissgesättigtem Barytwasser 5 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Es löst sich darin

sehr schwer und es scheidet sich ein auch in kochendem Wasser äusserst schwer lösliches Barytsalz aus. Dasselbe wird nach dem Verdünnen mit viel Wasser abfiltrirt und ausgewaschen, aus Filtrat + Waschwasser der überschüssige Baryt durch CO_2 entfernt, das Filtrat eingeengt, mit verdünnter H_2SO_4 angesäuert und mit Aether extrahirt; man erhält aus dem Aether nur eine geringe Menge des Spaltungsproductes, das mit dem in Form des Barytsalzes abgeschiedenen Hauptantheil vereinigt wurde.

Aus der nach dem Ausschütteln restirenden schwefelsauren Lösung wird der Aether verjagt, die Schwefelsäure mit verdünntem Barytwasser genau ausgefällt, das Filtrat zur Trockne verdampft; es bleiben 0,27 gr. Krystalle zurück, die sich in Wasser leicht lösen, süss schmecken, CuO mit dunkelblauer Farbe in Lösung halten. Sie werden in wenig Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt; es scheiden sich farblose Krystalle ab, die nach nochmaligem Umkrystallisiren bei 236—238° unter Dunkelfärbung schmelzen. Es ist also Glycocoll. Das Barytsalz des andern Spaltungsproductes, welches aus feinen Blättchen besteht, wird durch HCl zersetzt; die abfiltrirten und aus der Mutterlauge durch Ausschütteln mit Aether erhaltenen Krystalle sublimiren und schmelzen bei 182—183°, sind also β-Naphthoësäure. Im Ganzen erhielt ich von ihr 0,76 gr.

N-Bestimmung (nach Dumas) des Umwandlungsproductes der β-Naphthoësäure, für das ich den Namen β-Naphthursäure vorschlagen möchte:

0,2205 (bei 105° getrocknet, war wasserfrei) gab N = 11,4 cbcm. bei $t = 7^0$ und Ba = 764,5 mm.
N = 0,01391256 = 6,3 %.
Naphthursäure ($C_{13}H_{11}NO_3$) verl. N = 6,1 %.

Von Salzen derselben machte ich zunächst ein Ag-Salz durch Fällung des NH_3-Salzes mittelst $AgNO_3$. Es fiel flockig aus, liess sich aus heissem Wasser gut umkrystallisiren, und schied sich daraus in langen, feinen Nadeln aus.

0,3352 gr. (bei 105° getrocknet, war H_2O frei) gab 0,1073 Ag = 32,0 %.
Naphthursaures Silber verl. Ag = 32,1 %.

Ein Barytsalz, das ich aus einigen Mutterlaugen der β-Naphthursäure machte, war nicht ganz rein; zu einer neuen Darstellung fehlte mir das Material.

Die β-Naphthoësäure geht also nur zum Theil beim Kaninchen unverändert durch den Organismus hindurch, ein nicht unerheblicher Antheil paart sich mit Glycocoll und wird als β-Naphthursäure ausgeschieden.

II. Versuche beim Hunde.

1. β-Naphthoësäure.

Ein Hund von 15 Kilo Gewicht erhält 8 gr. β-Naphthoësäure als Natriumsalz, und zwar an 3 Tagen je $2^2/_3$ gr. in etwa 300 cbcm. Wasser gelöst, innerlich mittelst Schlundsonde. Er vertrug es sehr gut, der Urin war normal, gab nach dem Ansäuern keine krystallinische Abscheidung; er wird in derselben Weise, wie der Kaninchenurin, verarbeitet. Auf Zusatz verdünnter Schwefelsäure schied sich aus den in Wasser gelösten Rückständen der alkoholischen Auszüge Nichts aus. Die Aetherauszüge geben beim Abdestilliren auf etwa 50 cbcm. keine Abscheidung von Krystallen.

Der Aether wird darauf im Becherglas an der Luft vollständig verdunsten gelassen, der Rückstand mit Wasser übergossen, die ausgeschiedenen Krystalle am nächsten Tage abfiltrirt, wiegen trocken 2,3 gr. Sie sublimiren vollständig, sind in Wasser sehr schwerlöslich und schmelzen nach einmaligem Umkrystallisiren bei 180°, sind also unveränderte β-Naphthoësäure.

Aus der ersten Mutterlauge erhielt ich durch Ausschütteln mit Aether nur eine geringe Menge eines auch nach wochenlangem Stehen nicht krystallinisch erstarrenden Syrups.

Woher das grosse Deficit stammte, — von 8 gr. verfütterter β-Naphthoësäure konnte ich nur 2,3 gr. wiedergewinnen — vermochte ich nicht zu eruiren, eine zweite Substanz konnte ich nicht auffinden; jedenfalls aber war der β-Naphthoësäure keine Spur der beim Kaninchen erhaltenen β-Naphthursäure beigemengt.

2. α-Naphthoësäure.

Derselbe Hund erhielt 10 gr. als Natriumsalz innerlich in täglichen Dosen von 2,5 gr. in viel Wasser gelöst. Der Urin gab beim Ansäuern niemals Ausscheidung von Krystallen. Aus den wie sonst gewonnenen Aetherauszügen schied sich beim Abdestilliren auf 50 cbcm. Nichts aus. Der Aether wird darauf ganz verdunstet, der Rückstand mit Wasser übergossen, die ausgeschiedenen, noch mit etwas Harz vermengten Krystalle nach 24 Stunden abfiltrirt und ausgewaschen, wiegen trocken 8,0 gr.

Aus ihrer Mutterlauge erfolgt noch nachträglich eine geringe Krystallisation, 0,08 gr. farbloser Blättchen, die N-haltig sind und bei 153—155° schmelzen; nach mehrmaligem Umkrystallisiren schmelzen sie constant bei 155° und haben die Eigenthümlichkeit, in trockenem Zustande beim Zerreiben weit aus der Schale herauszuspritzen. Zu einer weiteren Untersuchung reichten sie nicht aus.

Es stellte sich jedoch bald heraus, dass dieselbe Substanz auch den zuerst gewonnenen 8 gr. beigemengt war. Dieselben erwiesen sich nämlich als N-haltig und zwar als ein Gemenge unveränderter α-Naphthoësäure mit einer N-haltigen Säure, die anscheinend in Wasser etwas leichter löslich war, als die Naphthoësäure. Zur Trennung beider Substanzen von einander kochte ich das Gemenge mit viel Wasser aus, filtrirte von dem noch ungelösten Antheil ab und kochte diesen noch einmal mit Wasser aus. Der jetzt noch nicht gelöste Theil war reine α-Naphthoësäure. Aus dem zweiten Filtrate scheidet sich nur noch N-freie Naphthoësäure ab, während ich aus dem ersten 1,2 gr. N-haltige Krystalle erhielt. Die Mutterlaugen wurden darauf genau neutralisirt, eingeengt, mit verd. H_2SO_4 angesäuert und mit Aether extrahirt, der Aetherrückstand wurde krystallinisch; er wiegt nach dem Absaugen auf einer Thonplatte 1,3 gr. und ist ebenfalls N-haltig. Beide Portionen, zusammen also 2,5 gr., enthalten noch α-Naphthoësäure, die auf die eben beschriebene Art nur sehr schwer zu entfernen war. Nach vielfachem Herumprobiren erwies sich mir folgender Weg als der zweckmässigste: ich löste das

Gemenge in wenig Aether und fällte es nach dem Filtriren mit Petroläther; es schieden sich 0,3 gr. farbloser, sternförmig gruppirter Nadeln aus, ausserdem ein brauner, fester Bodensatz, der durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser, in dem ein Theil als braunes Oel ungelöst blieb, und Entfärbung mit Thierkohle gereinigt werden konnte. Es scheidet sich zunächst eine milchige Trübung aus, die allmälig krystallinisch erstarrt. Im Ganzen konnte ich so an fast reiner Säure 1,5 gr. erhalten, jedoch ist in dem Urin anscheinend bedeutend mehr von der Substanz vorhanden.

Nach mehrmaligem Umkrystallisiren aus heissem Wasser, aus dem sie sich zunächst immer als milchige Trübung ausschied, erhielt ich sie in asbestartig verfilzten Nadeln, die nach dem Trocknen im Exsiccator ungemein spröde werden, beim Zerreiben weit umherspritzen und an dem Pistill wie electrisch haften bleiben. Sie schmelzen constant bei 153° und sind wasserfrei.

Wegen des geringen, mir zu Gebote stehenden Materials konnte ich eine genaue Untersuchung nicht ganz durchführen, sondern musste mich auf eine N-Bestimmung und einen Spaltungsversuch beschränken. Ein Silbersalz, das ich darzustellen versuchte, erhielt ich nur als amorphe Gallerte und in so geringer Menge, dass ich von einer Analyse Abstand nahm.

Nach dem Resultate der Untersuchung, die ich sogleich beschreiben werde, handelt es sich auch hier wiederum um eine Synthese der α-Naphthoësäure mit Glycocoll zu einer hippursäureähnlichen Verbindung, die ich α-Naphthursäure nennen möchte.

Die N-Bestimmung nach Kjeldahl ergab etwas zu hohen Werth:

0,1943 gr. gaben NH_3 entsprechend 3,7 cbcm. $^1/_4$ Normalnatronlauge
= 0,01295 N = 6,6 %,
verl. N = 6,1 %.

Den Spaltungsversuch stellte ich mit 0,7 gr. der noch nicht ganz reinen Substanz an. Sie wurde mit starkem Barytwasser am aufsteigenden Kühler 4 Stunden gekocht, das Reactionsproduct in viel Wasser gelöst, der überschüssige

Baryt durch CO_2 entfernt, das Filtrat auf etwa 20 cbcm. eingedampft, mit H_2SO_4 angesäuert und mit Aether extrahirt. Man erhält daraus 0,5 gr. Krystalle, die vollständig sublimiren, N-frei sind und bei 162° schmelzen, also α-Naphthoësäure sind.

Aus der nach dem Ausschütteln mit Aether restirenden schwefelsauren Lösung wird nach Verjagen des Aethers die H_2SO_4 durch Baryt genau ausgefällt, das Filtrat zur Trockne verdampft. Es bleiben 0,15 gr. Krystalle, die in Wasser leicht löslich sind, süss schmecken, CuO mit tiefblauer Farbe lösen, in Alkohol und Aether unlöslich sind und nach dem Umkrystallisiren bei 235° unter Dunkelfärbung schmelzen, also Glycocoll sind.

Die Naphthoësäuren zeigen demnach das sehr merkwürdige Verhalten, dass bei Kaninchen die α-Säure unverändert, die β-Säure dagegen nach Paarung mit Glycocoll als β-Naphthursäure ausgeschieden wird, während bei Hunden umgekehrt die α-Säure die entsprechende Synthese eingeht, die β-Säure aber unverändert den Organismus verlässt.

Versuche mit Chinolinderivaten habe ich bereits begonnen, dieselben sind jedoch noch nicht abgeschlossen, auch beabsichtige ich, noch complicirter zusammengesetzte Ringe auf ihr Verhalten, speciell ihre Fähigkeit, zu prüfen, Synthesen im Organismus einzugehen, und werde ich über die Resultate seiner Zeit Mittheilung machen.

Diese Versuche dürften vielleicht desshalb einiges Interesse beanspruchen, weil die meisten Alkaloide Abkömmlinge dieser Ringe sind und daher das Studium ihres Verhaltens im Organismus geeignet sein könnte, über die Schicksale der Alkaloide im Thierkörper Licht zu verbreiten.

Versuche über den Einfluss von Caffee- und Thee-Abkochungen auf künstliche Verdauung.

Von

C. Schultz-Schultzenstein.

(Der Redaction zugegangen am 15. Mai 1893.)

Nachdem ich mehrere künstliche Verdauungsversuche von gekochtem Hühner-Eiweiss unter Hinzufügung von Genussmitteln zur Verdauungsflüssigkeit ausgeführt und deren Resultate zum Theil Herrn Professor Dr. Hoppe-Seyler mitgetheilt hatte, machte mich derselbe auf mehrere zu beobachtende Momente gütigst aufmerksam. Die Versuche wurden unter Beobachtung dieser Momente zweimal wiederholt mit Caffee und Thee.

Verdauende Flüssigkeit: Schweinemagen-Schleimhaut mit 0,16% HCl-haltigem Wasser ausgezogen und abfiltrirt. — Sowohl die Caffee- wie die Thee-Abkochung reagirten nicht auf Phenolphtaleïn oder rothes Lackmus, aber auf blaues Lackmus deutlich sauer. Nach beendeter Verdauung, welche jedesmal 8 Stunden lang bei einer Temperatur zwischen 37,5 und 39° — meist 38° C. — fortgesetzt wurde, reagirten sämmtliche Flüssigkeiten deutlich sauer. Der unten unter Nr. IV angeführte Versuch wurde gemacht, um zu controlliren, ob die Verdünnung mit 10 cbcm. Flüssigkeit an sich die Verdauung beeinflusste. — Nach beendeter Verdauung wurden die Flüssigkeiten durch gewogene Filter abfiltrirt, die Rückstände mit Filter im Vacuum getrocknet und zurückgewogen. Bei der Caffee- und Theeverdauung setzte sich noch auf dem Filter ausser dem Eiweiss-Rückstand noch eine schwarzbraune (Caffee) resp. gelbbraune (Thee) voluminöse klebrige amorphe Masse ab, welche als Rückstand mitgewogen ist. Besonders während der Verdauung mit Thee war diese Masse schon sehr früh (in der 5. Stunde) zu sehen. — Das Filtrat zeigte Pepton-

fällung mit HNO_3 und $CH_3COOH + NaCl$, aber bei dem Filtrat von der Caffee- und Thee-Verdauung war die Fällung sehr gering.

In 30 cbcm. Verdauungsflüssigkeit mit je 1½ gr. gekochtem Hühner-Eiweiss, welches in Stücke von ca. 1 cbmm. zerhackt war:

Es wurden verdaut:				
I. Ohne jeden Zusatz.	II. Zusatz von 10 cbcm. Thee-Abkochung[1]).	III. Zusatz von 10 cbcm. Caffee-Abkochung[2]).	IV. Zusatz von 10 cbcm. Aqua destill.	
94,67 %	68,66 %	61,34 %	93,34 %	Erster Versuch.
94 %	64,67 %	61,24 %	91,32 %	Zweiter Versuch.

Die verhältnissmässig geringe Menge Verdauungsflüssigkeit wurde gewählt, um den Verhältnissen im Magen recht nahe zu kommen. — Frühere Versuche, bei denen das Eiweiss nicht so klein zerhackt war, ergaben für Caffee- und Thee-Verdauung noch ungünstigere Resultate.

Zwei Parallelversuche mit einem Glycerin-Auszug der Schweinemagen-Schleimhaut und HCl-Zusatz zeigten dem Augenschein nach ähnliche Resultate, wie die oben angegebenen; wegen der Dickflüssigkeit der Objecte war aber ein Filtriren und Wiegen ausgeschlossen.

Die Wägungen, Titrirungen u. s. w. zu den hier mitgetheilten Verdauungsversuchen habe ich im Göttinger chemischen Laboratorium beim Herrn Professor Dr. Wallach ausgeführt, die künstliche Verdauung selbst in meinem Brutschrank in meinem Hause. Die Versuche habe ich mit Herrn Professor Dr. Lehmann hier durchgesprochen, welcher die befolgte Methode billigte.

Göttingen, den 9. Juni 1893.

C. Schultz-Schultzenstein.

[1]) Die Thee-Abkochung bestand aus 100 cbcm. Wasser mit 6 gr. schwarzen Thees.

[2]) Die Caffee-Abkochung bestand aus 100 cbcm. Wasser mit 12 gr. gebrannten Caffees.

Ueber einen in den thierischen Geweben sich vollziehenden Reductionsprocess.

Von

Dr. Rudolf Cohn, Privatdozent.

(Aus dem Universitätslaboratorium für med. Chemie u. Pharmakologie zu Königsberg i. Pr.)

(Der Redaction zugegangen am 28. Mai 1893.)

In meiner Arbeit: «Ueber das Auftreten acetylirter Verbindungen nach Fütterung mit Aldehyden»[1]) habe ich unter Anderem den Nachweis erbracht, dass der m-Nitrobenzaldehyd im Kaninchenorganismus nach innerlicher Verabreichung in Acetylamidobenzoësäure übergeht, also nach 3 Richtungen hin Veränderungen erleidet, indem einmal die Aldehydgruppe zur Carboxylgruppe oxydirt, ferner die Nitrogruppe zur Amidogruppe reducirt wird, und drittens an dieser Stelle noch eine Synthese mit Essigsäure unter Wasserabspaltung eintritt. Das Auffallendste an dem ganzen Vorgang ist wohl die Reduction der NO_2- zur NH_2-Gruppe, die ja erst die Synthese mit Essigsäure ermöglicht. Ich hatte damals die Vermuthung ausgesprochen, dass diese Reduction in dem dazu sehr geeigneten langen Kaninchendarm vor sich ginge, dass aber die Gewebe des Körpers selbst daran unbetheiligt seien, und es schien mir mit dieser Annahme im Einklange zu stehen, dass beim Hunde dieser Reductionsprocess nicht in die Erscheinung trat, da dessen kurzer Darm nicht die genügende Gelegenheit dazu böte.

Ich glaubte nun aber doch der Frage nähertreten zu sollen, ob denn in der That die Reduction im Darmkanal vor sich gehe, oder vielmehr in den Geweben selber. Der Weg, den ich zur Entscheidung derselben einschlug, war ein-

[1]) Zeitschrift f. physiolog. Chemie, Bd. XVII, S. 274.

fach der, dass ich den m-Nitrobenzaldehyd mit Umgehung des Darmes subcutan applicirte. Trat dann in dem Urin die m-Acetylamidobenzoësäure auf, so war damit der Beweis erbracht, dass die Gewebe die Reduction vollzogen hatten.

Ich gab einem kleinen Kaninchen 1 gr. des m-Nitrobenzaldehyds in 10 cbcm. Olivenöl, das beim Erhitzen denselben leicht löst, beim vollständigen Abkühlen ihn zwar ausfallen lässt, indess bei Körpertemperatur ihn noch in Lösung hält, subcutan und verarbeitete den Urin der nächsten beiden Tage in der früher geschilderten Weise. Das Kaninchen starb übrigens am Abend des zweiten Tages unter heftigen Krämpfen.

Die Aetherauszüge des in Wasser gelösten und mit verdünnter Schwefelsäure angesäuerten Rückstandes der alkoholischen Harnextracte wurden auf etwa 20 cbcm. abdestillirt, bis zum nächsten Tage schieden sich ca. 0,15 gr. Krystalle ab, die sich als reine m-Acetylamidobenzoësäure erwiesen. Sie waren in Wasser sehr schwerlöslich, schieden sich daraus in stark gekrümmten, farblosen Nadeln aus, die bei 243° schmolzen, in wolkigen Flocken sublimirten und dabei intensiven Geruch nach Essigsäure entwickelten. Bei diesen ganz characteristischen Reactionen glaubte ich auf eine eingehende Analyse der Substanz verzichten zu können, da ich ihre Zusammensetzung in meiner früheren Arbeit mit Sicherheit erwiesen hatte.

Der Aether wurde nun ganz abdestillirt, der Rückstand mit Wasser übergossen 24 Stunden stehen gelassen, er wird krystallinisch mit etwas Harz vermengt, das auf einer Thonplatte abgesogen wird, und wiegt trocken 0,3 gr. Durch vorsichtiges mehrmaliges Verreiben mit Aether konnte ich aus ihm 0,13 gr. m-Nitrobenzoësäure entfernen, der Rückstand, also 0,17 gr., erwies sich ebenfalls als m-Acetylamidobenzoësäure. Aus der nach dem Uebergiessen des Aetherrückstandes mit Wasser erhaltenen Mutterlauge stellte ich durch Ausschütteln mit Aether noch 0,1 gr. m-Nitrohippursäure dar, die bei 163° schmolz.

Es ist nach diesem Versuche nicht daran zu zweifeln, dass der zur Bildung der Acetylamidobenzoësäure die Ver-

anlassung gebende Reductionsprocess nicht in den Darmkanal, sondern in die Gewebe selbst verlegt werden muss. Der naheliegende Einwand, der Aldehyd könnte erst in den Darm ausgeschieden sein und hier secundär die Umwandlung erlitten haben, widerlegt sich schon allein dadurch, dass die Menge des Reductionsproductes nach subcutaner Verabreichung eine über 3 Mal so grosse ist, als nach innerlicher, denn in dem vorliegenden Versuche erhielt ich nach 1 gr. 0,32 gr., also 32 %, während ich in allen früheren Versuchen nie mehr, wie etwa 10 %, erhalten hatte.

Um nun noch einen Einblick in die näheren Bedingungen, die auf das Zustandekommen der Reduction von Einfluss sein könnten, zu gewinnen, untersuchte ich, ob auch nach Darreichung von m-Nitrobenzoësäure der Reductionsprocess in die Erscheinung träte.

Ich gab zu diesem Zwecke einem Kaninchen 5 gr. der m-Nitrobenzoësäure als Na-Salz in 10procentiger Lösung subcutan in 2 Mal täglichen Dosen von 1—1,5 gr. Aus den wie gewöhnlich erhaltenen Aetherauszügen schied sich beim Abdestilliren auf 20 cbcm. Nichts aus. Der Aether wurde darauf ganz verdunstet, der mit Wasser übergossene Rückstand erstarrte bis zum nächsten Tage krystallinisch, wog 3,4 gr. Aus der Mutterlauge wurde durch Extraction mit Aether noch eine geringe Menge Krystalle erhalten, deren Schmelzpunkt 163° und sonstige Eigenschaften sie als m-Nitrohippursäure identificiren liessen.

Die 3,4 gr., welche vollständig ohne Auftreten des Geruches nach Essigsäure sublimirten, wurden aus heissem Wasser, in dem sie sich, nachdem sie zu einem Oele zusammengeschmolzen sind, nicht allzuschwer lösen, unter Entfärbung mit Thierkohle umkrystallisirt; es schieden sich 2,3 gr. Krystalle ab, die bei 141° schmolzen, vollständig sublimirten, ohne dass sich der Geruch nach Essigsäure entwickelte, also m-Nitrobenzoësäure sind. Sie lösten sich bis auf einen minimalen Rest leicht in sehr wenig Aether. Der äusserst geringe, darin unlösliche Rückstand wurde aus etwa 1—2 cbcm. Wasser, in dem er sich beim Erhitzen ziemlich leicht löste, umkrystalli-

sirt; es schieden sich mikroskopische, prismatische Nadeln aus, die bei 220° schmolzen. Zu weiteren Versuchen reichten sie nicht mehr.

Ob es sich dabei um eine Spur m-Acetylamidobenzoësäure handelte, vermochte ich danach nicht mit Sicherheit zu entscheiden, ich bin eher geneigt, anzunehmen, dass es keine solche war, da die äusseren Eigenschaften nicht ganz stimmten, auch der Schmelzpunkt über 20° zu tief lag. Aber selbst, wenn es m-Acetylamidobenzoësäure gewesen ist, so war doch die Menge eine so geringe, höchstens wohl einige mgr., dass sie bei der uns hier interessirenden Frage kaum in Betracht kommen konnte.

Es ist also merkwürdiger Weise zum Zustandekommen der Reduction das gleichzeitige Vorhandensein der Aldehydgruppe in der Verbindung allem Anscheine nach unbedingtes Erforderniss, tritt an die Stelle der COH- die COOH-Gruppe, so wird die Reduction der NO_2 Gruppe verhindert. Auch noch nach einer anderen Richtung zeigt sich die COH-Gruppe von Wichtigkeit, indem nämlich die Synthese mit Essigsäure ebenfalls nur dann stattfindet, wenn in der Verbindung die COH-Gruppe vorhanden ist. Nitrobenzaldehyd paart sich nach Reduction der NO_2-Gruppe mit Essigsäure, nicht dagegen, wie ich früher nachgewiesen habe, die fertig eingeführte Amidobenzoësäure, nach deren Darreichung, wie Salkowski gefunden und ich bestätigen konnte, Uramidobenzoësäure in den Harn übergeht. Ich zweifle nach Allem nicht daran, dass verfütterter m-Amidobenzaldehyd als Acetylamidobenzoësäure ausgeschieden werden wird, doch stehen Versuche nach der Richtung noch aus.

Die Reductionsvorgänge im Thierkörper sind seit den bekannten Untersuchungen von Ehrlich unserem Verständnisse erheblich nähergerückt, indessen doch noch lange nicht aufgeklärt, es dürfte daher jeder, auch noch so kleine Beitrag, wie ihn die vorstehende Mittheilung liefert, der uns die näheren Bedingungen, unter denen solche Reductionen in den Geweben ablaufen, deutlicher erkennen lässt, der Beachtung werth erscheinen.

Ueber die specifische Drehung des Glykogens.

Von

Huppert.

(Aus dem medicinisch-chemischen Laboratorium der k. k. deutschen Universität in Prag.)

(Der Redaction zugegangen am 29. Mai 1893.)

Wenn eine optisch active Substanz ein optisch actives Inversionsproduct liefert und die specifische Drehung des Products, sowie diejenige Menge des Products bekannt sind, welche die Substanz bei der Inversion liefert, so lässt sich die specifische Drehung der dem Versuch unterworfenen Substanz ohne Wägung derselben ermitteln.

Wo die Bedingungen zur Ausführung dieses Verfahrens gegeben sind, bietet es den Vortheil, dass man sich mit der Reindarstellung der Substanz nur bis zur Entfernung aller fremden optisch activen Substanz oder solcher, welche die Drehung überhaupt störend beeinflusst, zu befassen hat. Das Trocknen der Substanz entfällt ganz. Die absolute Reindarstellung der Substanz und das völlige Trocknen, wie sie die Bestimmung der spec. Drehung durch Wägung erfordert, sind aber oft schwer zu erreichen und die specifische Drehung wird dann leicht unsicher. Ein weiterer nicht gering zu veranschlagender Vortheil ist der, dass man, wie ich zeigen werde, mit viel weniger Substanz auskommen kann, als zur Bestimmung der specifischen Drehung durch Wägung nöthig ist.

Dieses Verfahren lässt sich sehr wohl auf die Bestimmung der specifischen Drehung des Glykogens anwenden. Die spec. Drehung des Inversionsproducts aus dem Glykogen, des Traubenzuckers, ist mit Sicherheit bekannt; für schwache Concentrationen, genauer für 1 gr. in 100 cbcm., ist $[\alpha]_D = 52,5^\circ$,

die Zusammensetzung des Glykogens darf zu $6\ C_6H_{10}O_5 + H_2O$ angenommen werden, und damit ist die Menge des Traubenzuckers gegeben, welche bei der Inversion aus dem Glykogen entsteht; es liefern dann 11 Theile Glykogen 12 Theile Traubenzucker.

Die für das Glykogen angenommene Formel $6\ C_6H_{10}O_5 + H_2O$ bedarf noch der Begründung.

Zunächst ist die Annahme eines Moleküls Wasser in der Verbindung keine willkürliche, wie man glauben könnte. Geht man von der begründeten Voraussetzung aus, dass bei der Aneinanderlagerung je zweier Hexosen immer ein Molekül Wasser austritt, so kommt den zusammengesetzten Kohlenhydraten die allgemeine Formel $n C_6H_{12}O_6 - (n - 1\ H_2O)$ zu, welche sich auflösen lässt in $n C_6H_{10}O_5 + H_2O$. Diese Formel ist also ein einfacherer rechnungsmässiger Ausdruck für die complicirtere, den Sachverhalt unmittelbar darstellende.

Die Formel $6\ C_6H_{10}O_5$, H_2O verlangt 43,64 % C und 6,26 % H. Külz und Borntraeger[1]) fanden bei der Analyse eines nach Brücke dargestellten sehr reinen Leberglykogens, das bei 100° getrocknet war, im Mittel aus 6 Bestimmungen 43,61 % C und 6,45 % H; S. Fränkel[2]) im Mittel aus 3 Bestimmungen 43,66 % C und 6,38 % H bei der Verbrennung von Glykogen, das mittelst Trichloressigsäure dargestellt und bei 110° getrocknet war. Ich selbst habe in einem gleichfalls aus Leber dargestellten und bei 110° getrockneten Glykogen 43,62 % C und 6,25 % H gefunden. Die aufgestellte Formel darf also als die richtige betrachtet werden[3]).

Nach Boehm und Hoffmann[4]) kommt dem bei 110° getrockneten Glykogen aber die Formel $11\ C_6H_{10}O_5$, H_2O, mit 40,00 % C und 6,27 % H zu. Külz und Borntraeger dagegen bestimmten in demselben Präparat, welches zu den angeführten Analysen gedient hatte, nach dem Trocknen bei 110° im Mittel aus 4 Verbrennungen 43,87 % C und 6,39 % H. Aus diesem Ergebniss und aus den oben angeführten, von Fränkel und von mir ermittelten Zahlen folgt also, dass das Trocknen bei höherer Temperatur allein die Zusammensetzung des Glykogens nicht verändert. Wohl aber dürfte unnöthig langes Trocknen hierauf von Einfluss sein. Fein

---

[1]) E. Külz und A. Borntraeger, Pflüger's Archiv, Bd. 24, S. 26, 1881.

[2]) S. Fränkel, Pflüger's Archiv, Bd. 52, S. 128, 1892.

[3]) Die Formel $5\ C_6H_{10}O_5 + H_2O$ verlangt 43,48 % C und 6,28 % H, die Formel $7\ C_6H_{10}O_5 + H_2O$ 43,76 % C und 6,24 % H. — Sabanejew (Zeitschr. f. physikal. Ch., Bd. 5, S. 192) schreibt dem Glykogen auf Grund der Gefrierpunktsbestimmung die Formel $10\ C_6H_{10}O_5$ zu.

[4]) R. Boehm und F. A. Hoffmann, Archiv f. exper. Pathol., Bd. 10, S. 14, 1879.

gepulvertes Glykogen erreicht bei 110° schon in einem einzigen Tag constantes Gewicht, während bei krümligem Glykogen das Trocknen eine Reihe von Tagen in Anspruch nimmt; die oberflächlichen Schichten werden dabei eine weitergehende Zersetzung erleiden, während die inneren noch hygroskopisches Wasser enthalten.

Aus den oben angeführten Daten lässt sich die spec. Drehung des Glykogens in folgender Weise berechnen. Ist α der beobachtete Drehungswinkel der Glykogenlösung, α' der beobachtete Drehungswinkel des entstandenen Traubenzuckers bei derselben Rohrlänge und ohne Aenderung der Concentration, so ist für das Glykogen

$$[\alpha]_D = \frac{\alpha\ 12}{\alpha'\ 11}\ 52,5$$

Die Berechnung ist im Grunde dieselbe wie die aus der durch Wägen bestimmten Concentration der Glykogenlösung; nur ermittelt man hier die Concentration der Glykogenlösung aus der durch Polarisation bestimmten Menge des gebildeten Zuckers. Hat die beobachtete Drehung des gebildeten Zuckers den Winkel α' betragen, so enthält die Zuckerlösung in 100 cbcm. $\frac{100\ \alpha'}{52,5}$ gr.; das entsprechende Gewicht des Glykogens ist $\frac{11}{12}$ mal so gross, als das Gewicht des Zuckers, also $\frac{100\ \alpha'}{52,5}\ \frac{11}{12}$ gr. Aus dieser Glykogenmenge und dem beobachteten Drehungswinkel der Glykogenlösung lässt sich dann die spec. Drehung des Glykogens wie gewöhnlich berechnen. Ist dieser Winkel α, so beträgt die spec. Drehung des Glykogens $\frac{100\ \alpha\ 12.\ 52,5}{100\ \alpha'\ 11}$, d. i. gleich dem oben angeführten Werthe.

Auf diese Weise habe ich die Bestimmung der spec. Drehung des Glykogens vorgenommen. Ob diese nöthig gewesen ist, kann fraglich erscheinen, da schon mehrere solche Bestimmungen vorhanden sind. Allein diese Bestimmungen lassen über die wahre Grösse im Unsicheren, auch wenn man nur solche Bestimmungen in Betracht zieht, die mit reinem Material und besseren Hilfsmitteln ausgeführt wurden. Es fanden Boehm und Hoffmann[1]) im Mittel aus 7 Bestimmungen $[\alpha]_j = 226,7°$, mit Schwankungen zwischen 212,8 und 238,0°, E. Külz[2]) im Mittel aus 14 Bestimmungen $[\alpha]_j = 211°$ mit

---

[1]) Boehm u. Hoffmann, Arch. f. exper. Pathol., Bd. 7, S. 492, 1877.

[2]) E. Külz, Pflüger's Archiv, Bd. 24, S. 88.

den Grenzwerthen 203,5 und 225,6, Landwehr[1]) $[\alpha]_D = 213{,}3^\circ$, Fränkel[2]) im Mittel aus 4 Bestimmungen $[\alpha]_D = 197{,}9^\circ$. Cramer[3]) ermittelte in drei Einzelbestimmungen $[\alpha]_D$ zu 200,2° (195,0 — 205,1°). Mittelst dieser spec. Drehung wurde von ihm selbst, sowie von drei anderen Beobachtern fast stets weniger Glykogen bestimmt als durch Wägung; der für die spec. Drehung angenommene Werth war also zu gross. Rechnet man nach den Mittelwerthen der durch Wägung gefundenen Zahlen die spec. Drehung um, so ergibt sich nach den Bestimmungen von Cramer $[\alpha]_D = 184{,}5^\circ$, nach denen der drei anderen Beobachter $[\alpha]_D = 188{,}5^\circ$.

Um alle diese Werthe unter einander vergleichen zu können, sind die Bestimmungen nach $[\alpha]_j$ umzurechnen nach $[\alpha]_D$. Da das Verhältniss zwischen beiden Grössen kein constantes, sondern von der Art der drehenden Substanz und noch von anderen Umständen abhängig ist[4]), so lässt sich von der Rechnung kein sicheres Resultat erwarten. Legt man jedoch der Umrechnung das von Broch für Quarz ermittelte Verhältniss von $\alpha_D = 0{,}8845\ \alpha_j$ zu Grunde, so ergibt sich die spec. Drehung des Glykogens nach der Bestimmung von Boehm und Hoffmann zu $[\alpha]_D = 200{,}5^\circ$, von Külz $[\alpha]_D = 186{,}6^\circ$[5]).

Die angeführten sieben Werthe der spec. Drehung des Glykogens weichen um 28,8° von einander ab, und wenn man die höchste Zahl, 213,3°, weglässt, immer noch um 16,0°. Es ist daher der Wunsch begreiflich, wenn es sich, wie mir, um die Identificirung eines Kohlenhydrates mit Glykogen handelt, aus eigener Anschauung Genaueres über die spec. Drehung des Glykogens zu erfahren. Wenigstens bot sich mir dann der Vortheil dar, dass ich mit ungefähr gleichen Fehlern behaftete Werthe unter einander verglich.

---

[1]) H. A. Landwehr, diese Zeitschr., Bd. 8, S. 170, 1883/84.

[2]) S. Fränkel, a. a. O. S. 130.

[3]) A. Cramer, Zeitschr. f. Biologie, Bd. 24, S. 100, 1888.

[4]) Vergl. Landolt, das optische Drehungsvermögen, 1879, S. 43; Neubauer, Analyse des Harns, 9. Aufl., S. 411.

[5]) H. T. Brown und G. H. Morris (Ann. d. Ch., Bd. 199, S. 179) setzen für Kohlenhydrate $\alpha_D = 0{,}8975\ \alpha_j$; darnach betrügen die obigen Werthe 203,5 und 189,7°.

Aus diesem Grunde habe ich die spec. Drehung des Glykogens aufs Neue bestimmt und mich dazu des geschilderten Verfahrens bedient.

Das dazu verwendete Glykogen war aus Hundeleber dargestellt. Es war sehr rein und enthielt nur Spuren Asche. Dasselbe Präparat diente zu der oben angeführten Analyse. Das Glykogen wurde in concentrirter Lösung im 1 Dmtr.-Rohr polarisirt. Der Drehungswinkel betrug bei den verschiedenen Lösungen 0,575 — 0,92°; die trübe Beschaffenheit der Glykogenlösung setzt der Concentration diese Grenze. Die Drehung der Zuckerlösung wurde im 2 Dmtr.-Rohr ermittelt.

Zur Verzuckerung wurde die Glykogenlösung auf 100 cbcm. mit 5 und mit 10 cbcm. 8fach verdünnter Schwefelsäure, oder mit 10 und 15 cbcm. Salzsäure von 1,12 Dichte versetzt. Die Mischungen enthielten somit 1,1 und 2,1 % H_2SO_4 und 2,5 und 3,6 % HCl. Die Glykogenlösungen und die Säuren wurden mit Normalbüretten zusammengemessen. Selbstverständlich wurde bei der Berechnung der spec. Drehung auf die Verdünnung der Glykogenlösung durch die Säuren und auf die Rohrlängen Rücksicht genommen.

Man kann ohne Aenderung des Resultats auch so verfahren, dass man die Glykogenlösung erst nach Zusatz der Säure polarisirt; die Inversion des Glykogens erfolgt in der Kälte so langsam, dass sie die Bestimmung des Drehungswinkels nicht beeinflusst.

Um die Concentration der Lösungen während des Erhitzens unverändert zu erhalten, wurden die Lösungen in Glasrohre eingeschmolzen. Erhitzt wurde im siedenden Wasserbad. Die Lösung mit 1,1 % Schwefelsäure hatte das Maximum der Drehung nach 12 St. noch nicht erreicht, aber nach 18 St., die Lösung mit 2,1 % Schwefelsäure nach 6 St. noch nicht, aber nach 12 St., während in den mit Salzsäure versetzten Lösungen das Glykogen schon nach 3 St. vollständig in Zucker übergeführt war. Nur zeigte die Lösung mit 15 cbcm. Salzsäure auf 100 cbcm. einen Stich ins Gelbe, während die mit nur 10 cbcm. Salzsäure farblos geblieben war. Dass die Salzsäure auf die Glieder der Stärkegruppe schneller einwirkt als andere Säuren, ist schon von Sachsse[1]) hervorgehoben worden; es ist das verständlich, da die Salzsäure (neben der Salpetersäure) unter den Säuren die relativ stärkste ist.

Zu bemerken ist noch, dass die Gegenwart der Säuren in der angegebenen Concentration keinen merkbaren Einfluss auf die spec. Drehung des Zuckers hat.

Wenn eine Glykogenlösung im 1 Dmtr.-Rohr zwischen 0,92 und 0,575° dreht, wie die zum Versuch gebrauchten, so macht ein Fehler in der Bestimmung des Drehungswinkels von nur 0,005° einen Fehler in der spec. Drehung von rund 1—3° aus. Es wurde daher auf die Drehungs-

---

[1]) Sachsse, Chem. Centralbl. 1877, S. 733.

bestimmung besondere Sorgfalt verwendet. Zur Polarisation diente ein Polarimeter nach Lippich von Rothe in Prag, an welchem sich 0,005° noch ablesen, und die Hälfte noch schätzen liess. Zur Ausgleichung der Beobachtungsfehler wurde immer eine grössere Anzahl von Ablesungen vorgenommen.

Eine Glykogenlösung von der verwendeten Concentration enthält in 100 cbcm. 0,3—0,47 gr. Glykogen. Da man zum Füllen des Dmtr.-Rohres, auch wenn es weit ist, recht wohl mit 20 cbcm. Lösung auskommen kann, so reicht zur Bestimmung der spec. Drehung des Glykogens 0,06—0,10 gr. Substanz aus, ein Vortheil, der nicht zu unterschätzen ist

Nach diesem Verfahren hat sich die specifische Drehung des Glykogens in 5 Versuchen ergeben zu

$[\alpha]_D$ = 195,61, 196,25, 196,68, 197,17 und 197,45°,

das Mittel beträgt 196,63°[1]).

Da das Erythrodextrin dem Glykogen so ausserordentlich ähnlich ist, so schien es mir in diagnostischer Hinsicht von Interesse, die spec. Drehung des Erythrodextrins nach derselben Methode zu bestimmen, nach welcher die des Glykogens ermittelt worden war. Brown und Morris[2]) haben die Zusammensetzung des dem Erythrodextrin nahestehenden Amylodextrin nach der Raoult'schen Methode zu 14 $C_6H_{10}O_5 + H_2O$ gefunden. Es wäre demnach zu erwarten gewesen, wenn man die spec. Drehung des Erythrodextrins unter der Voraussetzung bestimmte, es habe die für das Glykogen angenommene Zusammensetzung 6 $C_6H_{10}O_5 + H_2O$, dass der für $[\alpha]_D$ berechnete Werth deutlich verschieden wäre von dem beim Glykogen gefundenen. Die Rechnung ergibt für das Amylodextrin $[\alpha]_D$ = 198,67°.

Das zu dem Versuch dienende Erythrodextrin war durch Malz aus Stärke dargestellt und färbte sich mit Jod gerade so weinroth, wie Glykogen. Eine Lösung desselben wurde mit 0,1 Vol. Salzsäure von 1,12 Dichte versetzt und im ge-

---

[1]) Das Mittel aus den auf S. 139 und 140 angeführten siebenBestimmungen von $[\alpha]_D$ beträgt mit meiner Umrechnung von α_j 195,9°, mit der Umrechnung nach Brown und Morris 196,8.

[2]) Brown und Morris, Chem. Centralbl. 1889, Bd. II, S. 123.

schlossenen Rohr 3 St. in siedendem Wasser gelassen. Vor dem Erhitzen betrug $2\,\alpha_D = 2{,}11^0$, nach demselben $2\,\alpha_D = 0{,}615^0$, woraus sich unter der gemachten Voraussetzung $[\alpha]_D = 196{,}50^0$ ergibt. Dieser Werth liegt dem für das Glykogen zu $196{,}63^0$ gefundenen so nahe, dass beide für identisch angesehen werden können. Es lässt sich also auch polarimetrisch das Erythrodextrin nicht vom Glykogen unterscheiden.

Um für diesen Zweck etwa noch einen Anhaltspunkt zu gewinnen, habe ich noch das Färbungsvermögen des Jod für diese zwei Kohlenhydrate in Betracht gezogen. Wenn beide durch Jod auch die gleiche Färbung annehmen, so wäre immer noch möglich gewesen, dass die dazu erforderlichen Jodmengen verschieden seien. Bei dem Versuch stellte sich aber heraus, dass Lösungen der beiden Stoffe von gleichem Drehungsvermögen, als man von ihnen gleiche Volumina mit gleichen Mengen verdünnter Jodlösung versetzte, in gleich dicker Schicht genau dieselbe Färbung darboten, so dass sie durchaus nicht von einander zu unterscheiden waren.

Auch die Spectren dieser Lösungen waren identisch. Es war eine von Gelb nach dem violetten Ende fortschreitende Verdunkelung des Spectrums wahrnehmbar. Auch Brücke[1]) hat im Spectrum des Jodglykogens keine Streifen, sondern nur eine allgemeine Absorption beobachtet. Das Spectrum ist gleich dem einer Jodjodkaliumlösung.

Für die Unterscheidung des Glykogens vom Erythrodextrin gibt also nach wie vor die Opalescenz der Glykogenlösung und die physikalische Beschaffenheit der festen Substanzen den Ausschlag.

---

[1]) Brücke, Sitzungsber. der k. Akad. der Wissensch., II. Abth., Bd. 63, S. 216, 1871.

Ueber das Vorkommen von Glykogen in Blut und Eiter.

Von

Huppert.

(Aus dem medicinisch-chemischen Laboratorium der k. k. deutschen Universität in Prag.)

(Der Redaction zugegangen am 29. Mai 1893.)

Im Blute kommen unter bestimmten Umständen, aber keineswegs immer, im Eiter dagegen stets Leucocyten vor, welche Substanz eingeschlossen enthalten, die sich durch Jod gerade so roth färbt, wie Glykogen. Fast alle Forscher, welche an den Leucocyten oder an festen Geweben die gleiche Farbenreaction gesehen haben, geben die fragliche Substanz eben dieser Reaction wegen wirklich für Glykogen aus. Allein nicht alle Gewebsbestandtheile, welche sich mit Jod weinroth färben, sind Glykogen oder enthalten Glykogen. So färbt sich die Marksubstanz der Nervenfasern mit Jod dem Glykogen zum Verwechseln ähnlich, und zwar nicht blos an einzelnen Stellen, sondern in der ganzen Masse, so dass man glauben könnte, wenn diese Farbenreaction allein beweisend wäre, die ganze Marksubstanz bestände aus Glykogen. Solcher Stoffe, welche sich gegen Jod wie Glykogen oder ihm ähnlich verhalten, aber bestimmt kein Glykogen sind, gibt es noch mehrere.

Wenn man sich über die chemische Natur des in den Leucocyten vorkommenden Körpers Aufschluss verschaffen will, müssen andere Wege der Untersuchung eingeschlagen werden. Unter Anderem könnte man untersuchen, ob sich aus Blut, normalem sowohl als solchem mit durch Jod färbbaren Leucocyten, wirklich Glykogen darstellen lasse. Fiele eine solche Untersuchung in verneinendem Sinne aus, so wäre es schwierig, den durch Jod färbbaren Bestandtheil der Leuco-

cyten für Glykogen zu erklären, während umgekehrt der positive Ausfall des Versuchs eine solche Auffassung der Natur der fraglichen Substanz mindestens nicht als unzulässig erscheinen liesse. Ergäbe ferner die quantitative Untersuchung für das Blut mit färbbaren Leucocyten einen grösseren Gehalt an Glykogen als für normales Blut, so wüchse die Wahrscheinlichkeit für die Annahme, dass in den durch Jod färbbaren Einschlüssen der Leucocyten Glykogen enthalten sei.

Dass es möglich sei, aus Blut Glykogen darzustellen, darüber liegen zwar schon von Georg Salomon[1]) bestimmt lautende Angaben vor, aber diesen sind alsbald nach ihrer Veröffentlichung von berufener Seite so gewichtige Zweifel entgegengesetzt worden[2]), dass es unthunlich erscheinen muss, aus ihnen allein weiter gehende Folgerungen abzuleiten. Salomon hat bis in die jüngste Zeit nicht blos Nichts gethan, um die vorgebrachten Bedenken zu entkräften, sondern er hat auch dann noch Nichts zur Klärung der Sachlage beigetragen, als spätere Untersuchungen seine Angaben gleichfalls nicht bestätigen konnten. Selbst über die von ihm befolgte Methode lässt er im Unklaren. Nur jetzt, wo seine Angaben von mir[3]) bestätigt worden sind, hat er in seiner Angelegenheit wieder Etwas von sich hören lassen, indem er die Priorität der Entdeckung für sich in Anspruch nimmt[4]). Uebrigens ist er selbst darüber in Zweifel, ob das Glykogen ein normaler Blutbestandtheil sei.

Bei dieser Sachlage blieb also weiter Nichts übrig, als aufs Neue zu untersuchen, ob im Blut wirklich Glykogen vorkomme. Ich habe desshalb mit Dr. Czerny[5]), der die Bedeutung der durch Jod färbbaren Leucocyten zum Gegenstand einer Untersuchung gemacht hat, die Lösung dieser Frage wieder in Angriff genommen.

---

[1]) G. Salomon, Deutsche med. Wochenschr. 1877, Nr. 35; Du Bois' Archiv, Bd. 2, S. 596 und 625, 1878.

[2]) Hoppe-Seyler, Physiolog. Chemie, S. 406 u. 790.

[3]) Huppert, Centralbl. f. Physiologie, Bd. 6, S. 394.

[4]) G. Salomon, daselbst S. 512.

[5]) A. Czerny, Archiv. f. exper. Pathologie, Bd. 31, S. 190, 1893.

Der Nachweis des Glykogens in Blut und Eiter.

Für die Darstellung und Beurtheilung des Resultats erscheint es zunächst zweckmässig, die verschiedenen von uns unternommenen Versuche zur Isolirung des Glykogens aus dem Blut darzulegen, insbesondere desshalb, weil sich aus ihnen die negativen Resultate Anderer ungezwungen erklären.

Bei der Ermittelung einer geeigneten Methode sind wir im Allgemeinen so verfahren, dass wir zu einigen hundert Cubikcentimeter Blut, welches durch Zusatz von Kaliumoxalat oder Fluorkalium am Gerinnen verhindert wurde, kleine Mengen Glykogen (0,05—0,1 gr.) hinzufügten und nachsahen, wieviel von dem Glykogen wieder gefunden wurde. Die Mengen des Glykogens wurde beide Male durch Polarisation bestimmt.

Am Nächsten lag es, das Verfahren von Brücke anzuwenden. In der vorliegenden Form schien es jedoch nicht wohl geeignet. Im Blut waren voraussichtlich nur Spuren Glykogen zu erwarten, und man musste darauf gefasst sein, grosse Mengen Blut, ein Liter oder mehr, in Arbeit nehmen zu müssen, wenn man hoffen durfte, das Glykogen überhaupt aufzufinden. Man hätte dann grosse Mengen des eiweissfällenden Reagens, und darauf, da sich die stark saure Flüssigkeit ohne Verlust an Glykogen nicht hätte concentriren lassen, wieder grosse Volumina Alkohol verwenden müssen. Das wiederholte Extrahiren des starken Quecksilberniederschlags war auch nicht gerade einladend. Es wurde daher versucht, ob es nicht thunlich sei, die Hauptmasse des Eiweisses durch einfache Coagulation zu entfernen.

Es wurde also das Blut nach genügend starker Verdünnung bei passend saurer Reaction und, um das Hämoglobin vollständig abzuscheiden, unter Zusatz von ungefähr 2 % Kochsalz, zunächst im Wasserbad, dann über freier Flamme coagulirt, und im Filtrat das zugesetzte Glykogen aufgesucht. Dabei kam es zunächst darauf an, das in Lösung befindliche Glykogen von den immer noch vorhandenen Eiweissresten zu trennen. Die dazu unternommenen Versuche sind folgende.

Wie die lösliche Stärke und das Amylodextrin nach Mörner und Sjöqvist[1]), so lässt sich auch das Glykogen in salzsaurer Lösung durch Phosphorwolframsäure fällen. In einer Glykogenlösung tritt durch das Reagens erst bei Gegenwart von viel mehr Salzsäure ein Niederschlag ein, als in einer Eiereiweisslösung. Da das phosphorwolframsaure Glykogen stark rechts dreht, das Glykogen sich überdem durch eine starke Salmiaklösung bei Gegenwart von Salzsäure von der Phosphorwolframsäure trennen lässt, so lag die Möglichkeit einer Bestimmung des Glykogens vor. Der Versuch ergab jedoch, dass in glykogenhaltiger Eiweisslösung bei verschiedenem Salzsäurezusatz beide Körper neben einander ausfielen.

Es schien uns weiter das von Landwehr[2]) beschriebene Verfahren zur Isolirung des Glykogens viel versprechend, da es mit demselben gelingen soll, aus grossen Mengen Blut oder Eiter, die frei von Glykogen seien, hinzugesetzte Spuren von Glykogen wiederzugewinnen. Allein mittelst dieses Verfahrens liess sich in den Blutfiltraten kein Glykogen nachweisen.

Wir verwendeten darauf zur Abscheidung des noch im Filtrat befindlichen Eiweisses das Verfahren von Brücke. Aber auch in diesem Falle wurde das dem Blut zugesetzte Glykogen nicht wieder aufgefunden.

Unseres Erachtens konnten zwei Umstände den Nachweis des in geringen Mengen zugesetzten Glykogens verhindern. Es konnte dasselbe von dem Eiweisscoagulum zurückgehalten werden, wohl nur mechanisch und nicht, wie Landwehr[3]) sowie Fränkel[4]) für andere Fälle annehmen, durch chemische Bindung; es konnte aber auch das Glykogen durch das diastasische Ferment des Blutes verloren gehen. Nach Lépine und Barral[5]) wird dieses durch eine Temperatur von 58° noch nicht vernichtet und es findet sonach beim Erwärmen

---

[1]) K. A. H. Mörner und J. Sjöqvist, Skandinavisches Archiv, Bd. 2, S. 468, 1891.

[2]) H. A. Landwehr, diese Zeitschrift, Bd. 8, S. 167, 1883/84.

[3]) Landwehr a. a. O.

[4]) S. Fränkel, Pflüger's Archiv, Bd. 52, S. 131, 1892.

[5]) Lépine und Barrel, Comptes rendus, T. 112, p. 1415, 1891.

des verdünnten Bluts zur Coagulation gewiss Zeit, Glykogen in Zucker überzuführen. Das Fluorkalium, welches wir dem Blut zur Verhinderung der Fibrinbildung zusetzten, hemmt zwar nach Arthus und Huber[1]) die Fäulniss, aber, was auch vom Oxalat gilt, nicht diese Enzymwirkung.

Dass in der That eine dieser Ursachen oder beide im Spiele seien, lehrte ein Versuch, bei welchem wir zu zwei Proben flüssigen, mit Wasser stark verdünnten Blutes von 750 cbcm. je eine Lösung von 0,1 gr. Glykogen hinzusetzten, das eine Mal zu dem noch kalten, das andere Mal, als bereits die ersten Anzeigen der Coagulation auftraten. Die Filtrate wurden dann weiter nach Brücke verarbeitet. Aus dem kalt mit Glykogen versetzten Blut wurden nur zweifelhafte Spuren, aus dem heiss mit Glykogen versetzten dagegen 0,047 gr. Glykogen, also die Hälfte, wiedergewonnen.

Welcher von den beiden Umständen vorwiegend bei dem Verschwinden des Glykogens in Betracht kommt, darüber lehrt dieser Versuch nichts. Um diese Frage zu entscheiden, haben wir zunächst das verschwundene Glykogen in dem Blutcoagulum gesucht. Zu diesem Zwecke wurde das Coagulum mit 2proc. Natronlauge auf dem Wasserbade solange erwärmt, bis die Masse nur noch schwach schleimig war und darauf die Lösung mit Jodquecksilberkalium und Salzsäure gefällt. Glykogen war dabei jedoch nicht nachweisbar, so dass es schien, als ob das Coagulum kein Glykogen enthalten hätte. Es wäre dann anzunehmen gewesen, dass das Glykogen blos wegen seiner Ueberführung in Zucker nicht wieder aufgefunden werden konnte.

Allein diese Auslegung des Versuchs brauchte nicht richtig zu sein, da eine so geringe Menge Glykogen, wie die, um welche es sich hier handelt, wohl auch bei der Behandlung des Eiweisses mit der Lauge zerstört worden sein konnte. In der That ist ein solcher Verlust möglich, wie folgender Versuch zeigt. Eine Auflösung von ganz reinem Glykogen in einer nur 0,64proc. Natronlauge wurde im geschlossenen

---

[1]) Arthus und Huber, Arch. de physiol. [5], T. 4, p. 659, 1892.

Rohr 3 Stunden im Wasserbad erhitzt. Die Lösung drehte im Decimeterrohr vor dem Erhitzen 0,95°, nach dem Erhitzen 0,88° und hatte einen deutlichen Stich ins Gelbe angenommen. Eine Drehungsverminderung von 0,07° bedeutet aber eine Einbusse von 35 mgr. Glykogen in 100 cbcm. Lösung. Dieser Verlust trat ein bei Verwendung einer nur 0,64 proc. Lauge. Da aber bei dem Auflösen des Blutcoagulum in 2 proc. Lauge eine grössere Menge Glykogen zerstört werden wird, so könnte die Wirkung der Lauge allein genügen, um die geringe, dem Blut zugesetzte Menge Glykogen zum Verschwinden zu bringen.

Durch den Ausfall der bisher beschriebenen Versuche ist nur durch Ausschliessung wahrscheinlich gemacht, dass das Glykogen desshalb nicht wieder zum Vorschein kommt, weil es von dem Blutcoagulum zurückgehalten wird. Ein weiterer Versuch mit positivem Resultat erwies die Richtigkeit dieser Annahme. Das in gewöhnlicher Weise erzeugte Blutgerinnsel ist hart und grobkörnig und es war wohl denkbar, dass einem minder derben Coagulum das Glykogen leichter entzogen werden könnte. Ein Verfahren aber, welches den Eiweissniederschlag in viel feinerer Vertheilung liefert, wurde in dem von Ritthausen zur Fällung der Eiweisskörper der Milch eingeführten gefunden. Das Blut wurde dementsprechend reichlich mit einer Lösung von Kupfersulphat oder Kupferacetat versetzt, verdünnt, und dann die stark saure Reaction durch Zusatz von Natronlauge bis auf eine Spur beseitigt. In der weiteren Behandlung der Flüssigkeit wichen wir dann insofern von dem Ritthausen'schen Verfahren ab, als wir aufkochten. Hat man genügend Kupfersalz zugesetzt, so erhält man ein so feinflockiges Coagulum, dass man es kaum zwischen den Fingern fühlt. In dem nach Brücke verarbeiteten Filtrat konnte dann dem Blut hinzugefügtes Glykogen wieder nachgewiesen werden. Wir haben den Glykogenzusatz bis auf 0,025 gr. auf 200 cbcm. Blut herabgemindert und selbst dann wurde das Glykogen nicht vermisst. Die Ausbeute betrug bei einem Zusatz von 0,025—0,1 gr. Glykogen um 50%, darüber und darunter. Dass die aufgefundene Substanz wirklich Glykogen war, ergab sich daraus, dass sie

eine trübe Lösung bildete, rechts drehte, sich mit Jod weinroth färbte und beim Kochen mit Salz- oder Schwefelsäure reducirenden Zucker lieferte.

Damit ist zweifellos erwiesen, dass bei der Coagulation des Blutes in gewöhnlicher Weise ein beträchtlicher Theil Glykogen im Niederschlag zurückgehalten wird. Andere Umstände mögen noch weitere Verluste bedingen. So ist aus den oben angeführten Gründen sehr wahrscheinlich, dass ein Theil des Glykogens auch durch das diastasische Ferment verloren geht. Da es uns aber blos darauf ankam, ein Verfahren zu finden, welches gestattet, kleine Mengen Glykogen aus Blut darzustellen, so haben wir keinen Anlass gehabt, den Gegenstand weiter zu verfolgen.

Das muss aber noch besonders hervorgehoben werden, dass die gewöhnliche Art der Eiweisscoagulation, der diastasische Process im verdünnten Blut und die Behandlung des Glykogens mit Lauge derartige Fehler im Aufsuchen kleiner Mengen Glykogen in eiweisshaltigen Flüssigkeiten zur Folge haben, dass sich daraus der Misserfolg einiger Forscher bei der Untersuchung von Blut und Eiter auf Glykogen in einfacher Weise erklärt.

O. Nasse[1]) trug Blut eines Kaninchens, eines Hundes und Pferdeblut alsbald nach der Gewinnung in heisses Wasser ein, coagulirte unter Zusatz von Essigsäure, fällte das eingedampfte Filtrat mit Alkohol und untersuchte den Niederschlag. Die wässerige Lösung desselben färbte sich nicht mit Jod und lieferte bei der Digestion mit Speichel keine Spur Zucker, reducirte jedoch nach mehrstündigem Kochen mit Schwefelsäure manchmal Kupferoxyd in alkalischer Lösung, aber nur sehr schwach. Auch in dem Niederschlag, welchen Eisessig in dem Filtrat vom coagulirten Blut hervorbrachte, konnte keine Spur eines Kohlenhydrats aufgefunden werden. Dieser negative Befund erklärt sich schon allein daraus, dass das Glykogen von dem Blutcoagulum zurückgehalten wird.

Barfurth[2]) hat das frische Blut dreier einzelner Kaninchen mit Wasser gekocht, das Coagulum längere Zeit ausgekocht, und das Decoct nach Brücke untersucht. Es wurde kein Glykogen gefunden. Dieses negative Resultat erklärt sich aus derselben Ursache, wie das von Nasse.

---

[1]) O. Nasse, De materiis amylaceis num in sanguine mammalium inveniantur disquisitio. Halis 1866, p. 32.

[2]) D. Barfurth, Arch. f. mikrosk. Anatomie, Bd. 25, S. 305, 1885.

· Prausnitz[1]) hat in 6 Ltr. Schweineblut nicht eine Spur Glykogen nachweisen können. Das Blut wurde sofort nach der Gewinnung in Wasser von 70—80° eingetragen und eine Stunde auf dieser Temperatur erhalten. Wie das Blut weiter verarbeitet wurde, ist nicht ersichtlich. Wurde das Glykogen nur in der vom Coagulum abfiltrirten Flüssigkeit gesucht, so konnte es dort, wie in unseren Versuchen, nicht gefunden werden; wurde das Coagulum in Lauge gelöst, so musste die geringe im Blut enthaltene Menge Glykogen zerstört werden.

Naunyn[2]) konnte in 1200 cbcm. direkt in kochendes Wasser entleerten Eiters aus einem Pyothorax keine Spur Glykogen auffinden.

Solche Beobachtungen sprechen also nicht gegen das Vorkommen von Glykogen in Blut und in Eiter.

Das Verfahren, welches uns weiterhin zur Darstellung des Glykogens aus Blut diente, war folgendes.

Da es wahrscheinlich war, dass das Glykogen in den farblosen Blutkörperchen enthalten ist, das Fibrin aber viel Leucocyten einschliesst, und auch nach unserer Erfahrung das Glykogen aus festen Massen nur schwer in das Lösungsmittel übergeht, so wurde das Blut nur in ungeronnenem Zustande untersucht. Zur Verhinderung der Gerinnung wurde das Blut Anfangs nach Arthus in soviel einer concentrirten Lösung vom Kaliumoxalat oder Fluorkalium aufgefangen, dass auf 1 Ltr. Blut vom (krystallisirten) Oxalat mindestens 1 gr., vom Fluorid mindestens 2 gr. kamen. Den Kaliumsalzen wurde wegen ihrer Leichtlöslichkeit vor anderen der Vorzug gegeben. Später wurde das Blut sofort bei der Entleerung mit $^1/_{10}$ Vol. oder mehr Kupferacetatlösung gemischt, wobei das Blut einen mässig dicken homogenen, von Gerinnseln freien Brei bildet. Darauf wurde das Blut noch mit mehr gesättigter Kupferacetatlösung versetzt, wovon für die verschiedenen Blutarten verschiedene Mengen erforderlich sind, wenn das beim Kochen entstehende Gerinnsel nicht grobkörnig ausfallen soll. Für Kalbsblut genügt im Ganzen $^1/_{10}$ Vol., für andres Blut nimmt man zweckmässig $^1/_4$ Vol. der Acetatlösung. Die Mischung wurde darauf auf das $1^1/_2$- bis 2fache verdünnt, mit Natronlauge bis zur schwach sauren oder neutralen Reaction versetzt, eine Zeit lang im Sieden erhalten und durch Faltenfilter heiss filtrirt. Das Filtrat ist blau und reagirt durch das noch in Lösung befindliche Kupfersalz deutlich sauer, stärker sauer als die Mischung vor dem Kochen. Der Niederschlag wurde sorgfältig vom Papier befreit, wenn nöthig mittelst eines feinmaschigen Metallsiebes und in der Regel noch zweimal ausgekocht. Das letzte Filtrat ist dann nur blassblau. Ein öfteres Auskochen des Niederschlags erhöht die Ausbeute an Glykogen nur unwesentlich.

---

[1]) W. Prausnitz, Zeitschr. f. Biologie, Bd. 26, S. 411, 1890.
[2]) Naunyn, Archiv f. exper. Pathol., Bd. 3, S. 95, 1875.

Statt des Acetats kann man auch ein anderes Kupfersalz verwenden, z. B. das Sulphat. Da aber die mit Natronlauge versetzte Flüssigkeit zuletzt mit Alkohol gefällt wird, so ist des Acetat vorzuziehen, weil das gebildete Natriumacetat beim Zusatz des Alkohols in Lösung bleibt, das Natriumsulphat aber zugleich mit dem Glykogen niedergeschlagen wird.

Machten die gewonnenen Filtrate nur ein kleines Volumen aus, so wurden sie im Wasserbad concentrirt, grosse Volumina dagegen wurden über freier Flamme eingekocht, und zwar jedes der drei Filtrate zunächst für sich. Zuletzt wurden die drei Portionen vereinigt und im Wasserbad soweit eingeengt, dass das Natriumacetat in der Kälte gerade noch in Lösung blieb. Es war zu befürchten, dass beim Einkochen der sauren Flüssigkeit Glykogen verloren geht; aber die saure Reaction rührte nicht von freier Säure, sondern vom Kupfersalz her. Der Verlust scheint nur gering zu sein. Wurde das Filtrat dagegen nicht bei saurer Reaction eingedampft, sondern vorher mit Natronlauge ganz oder nahezu ganz neutralisirt, so wurde viel weniger Glykogen gewonnen, als aus dem bei saurer Reaction eingedampften Filtrat. Vergleichsweise ist auch das Filtrat nicht eingekocht, sondern in dem von Schulze und Tollens[1]) für solche Zwecke empfohlenen Apparat von Yaryan concentrirt worden, in welchem die Flüssigkeit nur kurze Zeit der Siedehitze ausgesetzt bleibt; die Ausbeute von Glykogen war dabei jedoch nicht wesentlich grösser.

Die eingedampfte Flüssigkeit enthielt noch Eiweiss. Trichloressigsäure fällt dieses nur unvollständig; es wurde daher das Eiweiss durch Jodquecksilberkalium abgeschieden. Da Kupfersalze mit Jodiden Kupferjodür und Jod geben, so musste das Kupfer aus der eingedampften Flüssigkeit vor dem Zusatz des Jodquecksilberkaliums entfernt werden. Es erwies sich dazu nicht zweckmässig, dasselbe durch Schwefelwasserstoff zu fällen, da bei dieser Behandlungsweise Glykogen in erheblicher Menge verloren ging. Als vortheilhafter ergab sich das Fällen des Kupfers mit Schwefelammonium. Nach Zusatz desselben wurde die Flüssigkeit mit Essigsäure schwach angesäuert und im Waserbade erwärmt, wobei sich das Schwefelkupfer meistens gut absetzte. Es wurde dann mittelst der Saugpumpe durch ein Asbestfilter filtrirt und das Filtrat in bekannter Weise durch Jodquecksilberkalium und Salzsäure gefällt. Der Eiweissniederschlag wurde wieder durch ein Asbestfilter filtrirt, nur dieses hält den sehr fein vertheilten Niederschlag von phosphorwolframsaurem Ammonium zurück. Für diese Filtration muss der Asbest vorher mit concentrirter Salzsäure von Eisenoxydverbindungen frei gewaschen werden, weil sonst im Filtrat freies Jod auftritt, und sich das Glykogen mit diesem verbindet, was wohl besser vermieden wird. Es dürfte überflüssig erscheinen, das Schwefelkupfer und den Eiweissniederschlag gesondert abzufiltriren; man könnte das Eiweiss sogleich in der Flüssigkeit fällen, welche das Schwefel-

---

[1]) C. Schulze und B. Tollens, Ann. d. Chemie, Bd. 271, S. 46.

kupfer suspendirt enthält und von uns wurde auch in dem Fall so verfahren, wenn sich das Schwefelkupfer nicht in filtrirbarer Form abschied. Dieses abgekürzte Verfahren empfiehlt sich jedoch nicht, weil das Filtriren unverhältnissmässig viel Zeit in Anspruch nimmt und das Glykogen ebensolang mit der Salzsäure in Berührung bleibt.

Das eiweissfreie Filtrat wurde wie üblich mit 2 Vol. Alkohol von 96 % versetzt, der Niederschlag dann auf einem Asbestfilter gesammelt und mit 96 proc. Alkohol gewaschen. Ist der Niederschlag noch nicht weiss, so kann er noch einmal in Wasser gelöst und durch Alkohol gefällt werden. Das Glykogen ist dann schon so rein, dass man mit ihm alle gewöhnlichen Reactionen anstellen kann, aber noch nicht analysenrein.

Die Asbestfilter sind den Papierfiltern vorzuziehen, nicht blos weil sie dichter sind, sondern auch und hauptsächlich desshalb, weil sie sich leichter auswaschen lassen und das Glykogen von ihnen mit viel weniger Wasser vollkommen entfernt werden kann, als von Papierfiltern. Bei den Papierfiltern ist ferner eine Verunreinigung des Glykogens durch Stärke und dergl. zu befürchten; manche Papiersorten färbten sich durch Jod blau.

Die geringste Menge Blut, in welcher nach diesem Verfahren Glykogen noch nachgewiesen werden konnte, waren 200 gr. Hundeblut. Von Rindsblut gaben 500 gr. ein zweifelhaftes Resultat, 1 Kilo dagegen ein völlig überzeugendes. Von Blut, welches, wie das der Rinder, leicht in grösserer Menge beschafft werden konnte, sind immer 2,5—3 Kilo auf einmal verarbeitet worden.

Die Darstellung des Glykogens aus Eiter gestaltet sich nicht so umständlich, wie die aus Blut.

Man kann sich in der einfachsten Weise von der Gegenwart des Glykogens im Eiter überzeugen. Man braucht den Eiter nur stark mit Trichloressigsäure zu versetzen — ich habe das gleiche Volumen einer 10 proc. Trichloressigsäurelösung verwendet - und dem Filtrat das doppelte Volumen Alkohol von 96 % hinzuzufügen; der Niederschlag besteht wesentlich aus Glykogen.

Für die möglichst vollständige Gewinnung des Glykogens aus dem Eiter eignet sich dieses Verfahren jedoch nicht, weil die Flüssigkeit sehr schlecht filtrirt, durch Asbest mit der Saugpumpe noch langsamer als ohne Druck durch Papier, und weil aus dem schmierigen Niederschlag das Glykogen kaum vollständig ausgezogen werden kann. Dagegen ist die beim Blut angewandte Abscheidung der Hauptmenge des Eiweisses durch Kupferacetat auch hier gut brauchbar. Das weitere Verfahren vereinfacht sich aber gegenüber dem beim Blut in sofern erheblich, als sich das noch in Lösung gebliebene Eiweiss durch Trichloressigsäure leicht völlig ab-

scheiden läst. Das im Wasserbad eingedampfte kupferhaltige Filtrat wurde demnach sofort mit der genügenden Menge Trichloressigsäure versetzt, die Flüssigkeit durch Asbest abfiltrirt und aus dem Filtrat das Glykogen durch das doppelte Volumen Alkohol von 96 % gefällt. Das auf Asbest gesammelte Glykogen war grün gefärbt. Vollends rein wurde es erhalten, wenn es noch 1 oder 2 Mal in Wasser gelöst und die mit etwas Essigsäure versetzte Lösung wieder mit Alkohol gefällt wurde.

Das so aus dem Eiter gewonnene Glykogen war nach dem Waschen mit Alkohol und Aether analysenrein, das aus dem Blut dargestellte bedurfte noch einer weiteren Reinigung. Wiewohl das thierische Gummi, welches nach Freund[1]) gleichfalls im Blut vorkommt, beim Einkochen des Bluts zum Theil zerstört und aus der sauren Flüssigkeit, welche nach der Abscheidung des Eiweissrestes übrig bleibt, durch Alkohol nur unvollkommen gefällt wird, enthielt das Glykogen aus dem Blute doch noch einen Rest davon. Um es von ihm zu befreien, wurde die Lösung desselben mit einigen Tropfen reiner Natronlauge im Wasserbad zur Trockne verdunstet, der Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung von einem reichlichen gelbbraunen Niederschlag durch das Asbestfilter getrennt, das alkalische Filtrat mit dem doppelten Volumen Alkohol versetzt, der Niederschlag von der gelben Flüssigkeit durch Asbest abfiltrirt, nochmals in Wasser gelöst, und nach Zusatz von etwas Essigsäure wieder mit Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde auf einem Papierfilter gesammelt, mit Alkohol und mit Aether gewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet.

Die Eigenschaften des reinen Glykogens aus Blut und aus Eiter waren folgende.

Das reine Glykogen stellte ein weisses mehlartiges Pulver dar, lieferte mit Wasser eine opalescirende Lösung und konnte aus dieser durch Alkohol wieder gefällt werden. Die Lösung drehte rechts, färbte sich mit Jod braun und reducirte für sich nicht, wohl aber nach dem Kochen mit einer verdünnten Mineralsäure alkalische Kupferoxydlösung. Auch entwickelte der dabei entstandene Zucker mit Hefe Kohlensäure.

---

[1]) E. Freund, Centralbl. f. Physiologie, Bd. 6, S. 345, 1892.

Für den Gährungsversuch wurde die Inversion mit Schwefelsäure vorgenommen und die Schwefelsäure durch Kochen mit kohlensaurem Kalk wieder entfernt. Es wurde soviel von dem Glykogen verzuckert und die Lösung so stark concentrirt, dass die gebildete Kohlensäure als Gas auftreten konnte.

Weiter wurde die specifische Drehung der beiden Glykogene, und zwar nach dem von mir[1]) angegebenen Verfahren, bestimmt.

Die Glykogenlösungen wurden mit 0,1 Vol Salzsäure von 1,12 Dichte oder 0,1 Vol. 8fach verdünnter Schwefelsäure versetzt und ihre Drehung ermittelt. Dann wurden die Lösungen, in Glasrohre eingeschmolzen, die salzsäurehaltige 3 Stunden, die schwefelsäurehaltige 12 Stunden in siedendem Wasser verweilen gelassen und nach dem Erkalten die Drehung wieder bestimmt. Die angegebenen Verhältnisse genügen zur vollständigen Verzuckerung des Glykogens.

Vom Eiterglykogen wurde eine Drehungsbestimmung, vom Blutglykogen zwei an Präparaten verschiedener Darstellung ausgeführt.

Bei dem Eiterglykogen betrug vor der Verzuckerung $2\,\alpha_D = 1{,}72^\circ$, nach der Verzuckerung $2\,\alpha_D = 0{,}50^\circ$, woraus sich nach S. 139 für Glykogen $[\alpha]_D = 197{,}02^\circ$ berechnet.

Beim Blutglykogen war vor der Verzuckerung $2\,\alpha_D = 0{,}435^\circ$, nach der Verzuckerung $2\,\alpha_D = 0{,}1275^\circ$. Es beträgt demnach für das Glykogen $[\alpha]_D = 195{,}54^\circ$. — Die andere Lösung des Blutglykogens ergab vor der Verzuckerung $2\,\alpha_D = 0{,}7435^\circ$, nach derselben $2\,\alpha_D = 0{,}218^\circ$, demnach $[\alpha]_D = 195{,}33$.

Nach demselben Verfahren habe ich für reines Leberglykogen $[\alpha]_D = 196{,}63^\circ$, mit Schwankungen zwischen 195,6 u. 197,5° ermittelt. Die Uebereinstimmung der spec. Drehungen des Glykogens aus Eiter und aus Blut mit der des Glykogens aus Leber ist also, namentlich in Anbetracht der geringen zu den Versuchen verwendeten Glykogenmengen eine vollkommen genügende.

Endlich habe ich noch die Zusammensetzung des Glykogens aus Eiter ermittelt.

---

[1]) Huppert, diese Zeitschr., Bd. 18, S. 137.

Das Glykogen wurde nach dem Waschen mit Alkohol und mit Aether zuerst im Vacuum über Schwefelsäure, dann feingepulvert bei 105° getrocknet, wobei es schon in einem Tage constantes Gewicht angenommen hatte.

Bei der Verbrennung gaben 0,3171 gr. Substanz 0,5054 gr. CO_2 und 0,1797 gr. H_2O. Daraus berechnet sich nach Abzug von 0,5 mgr. Asche 43,54 °/₀ C und 6,31 °/₀ H, während die dem Glykogen zukommende Formel 6 $C_6H_{10}O_5$, H_2O 43,64 °/₀ C und 6,26 °/₀ H verlangt.

Mit dem Blutglykogen habe ich leider keine Elementaranalyse ausführen können. Von dem angesammelten kleinen Vorrath war bei den verschiedenen zunächst misslungenen Versuchen zur Reinbestellung des Präparates ein so grosser Antheil verloren gegangen, dass der nach der Polarisationsbestimmung bleibende Rest für die Analyse nicht mehr genügte. Die Ausbeute an Glykogen aus dem Blute ist so gering und die Darstellung einer zur Analyse ausreichenden Menge darum so ermüdend, dass ich auf die weitere Gewinnung von Glykogen aus Blut verzichtet habe. Die Bestimmung der spec. Drehung des Blutglykogens hat aber dieselben Werthe ergeben, wie bei reinem Glykogen anderer Herkunft; nach der zur Drehungsbestimmung verwendeten Methode heisst das, dass das Blutglykogen bei der Inversion durch Säure ebensoviel Zucker geliefert hat, wie andres Glykogen, und diese Thatsache beweist meines Erachtens ebenso gut wie eine Elementaranalyse, dass das Blutglykogen die Zusammensetzung besitzt, welche dem Glykogen überhaupt zukommt.

Ich betrachte daher das Vorkommen von Glykogen in Blut und Eiter als erwiesen.

Für das Vorkommen des Glykogens im Eiter wäre wohl ein strenger Nachweis nicht mehr erforderlich gewesen, nachdem Cramer[1]) im Institut von Külz in Empyemeiter und Lilienfeld[2]) unter der Leitung von Kossel in Lymphzellen Glykogen nachgewiesen und sie somit die Angaben von Salomon bestätigt haben. Anders verhält es sich mit dem

---

[1]) A. Cramer, Zeitschr. f. Biologie, Bd. 24, S. 97, 1888.
[2]) Lilienfeld, Du Bois' Archiv, Bd. 16, S. 174, 1892.

Vorkommen des Glykogens im Blut, zu welchem die Beobachtungen aus älterer und neuerer Zeit fast nur in Widerspruch stehen. Allein diese gegentheiligen Angaben sind, nach den nun vorliegenden weiteren Erfahrungen, entweder nicht beweisend, wie die oben S. 150 angeführten, oder sie lassen sich sogar zu Gunsten der Sache auslegen, wie die folgenden.

Brücke[1]) fand bei der Untersuchung von Kaninchenblut nach seiner Methode theils nur undeutliche, theils deutliche, aber doch nur geringe Spuren eines sich mit Jod roth färbenden Körpers; einmal trat die Reaction viel intensiver auf. Es gelang Brücke indessen nicht, genug Substanz zu gewinnen, um, wie er sagt, zu entscheiden, ob der Körper Glykogen oder (Erythro)-Dextrin sei. Wenn man aber die von mir beigebrachte Ergänzung der Eigenschaften der fraglichen Substanz hinzunimmt, so kann kein Zweifel darüber bestehen, dass Brücke in der That Glykogen vor sich gehabt hat.

Dann hat Brücke grössere Mengen Schweineblut untersucht. Eine Portion, welche in Kalilösung aufgefangen war, kochte er eine Weile und fällte sie dann mit Jodquecksilberkalium. Eine andere Portion war in Weingeist aufgefangen worden; nachdem sie vom Alkohol befreit worden war, wurde ein Theil mit Wasser, ein anderer Theil mit kohlensaurem Kali ausgekocht und dann nach der Brücke'schen Methode weiter verarbeitet. Aber in keinem dieser Fälle erhielt Brücke genug Substanz, im Maximum kaum so viel, dass die Reaction (mit Jod) als hinreichend rein und deutlich bezeichnet werden konnte, was begreiflich ist, da das Kochen mit Kalilösung dem Auffinden so geringer Mengen Glykogen, wie sie im Blut vorkommen, sicher sehr nachtheilig ist und das Coaguliren des Bluts mit Alkohol ebenso ein Hinderniss für die Isolirung des Glykogens bildet, wie die Coagulation durch Kochen. Fränkel[1]) konnte aus dem Niederschlag, welchen eine Mischung von Hühnereiweiss und Glykogen gegeben hatte, erst nach längerem Kochen mit Wasser wieder Glykogen gewinnen. Fränkel versetzte 25 cbcm. Eiweiss mit 0,25—1 gr. Glykogen, das ist aber sehr viel mehr Glykogen als im Blut im Verhältniss zum Eiweiss vorkommt.

Hoppe-Seyler berichtet in seiner Physiologischen Chemie (S. 406), dass zahlreiche Untersuchungen von ihm und Woroschiloff an grösseren Quantitäten von Hundeblut in Bezug auf den Nachweis von Glykogen ein negatives Resultat ergeben haben. Als einen weiteren Beleg für diesen Befund habe ich nur noch die Angabe von Hoppe-Seyler[2]) ausfindig machen können, dass im Chylus wie im Blut so gut wie gar kein Glykogen aufzufinden ist, was in der That der Wirklichkeit insofern entspricht, als die Glykogenmengen im Blut ausserordentlich gering sind.

[1]) S. Fränkel, a. a. O, S. 133.

[2]) Hoppe-Seyler, Pflüger's Archiv, Bd. 7, S. 410, 1873.

Das Verhalten des Glykogens im Eiter.

In den verschiedenen Eiterproben, welche zum Nachweis des Glykogens dienten, wurde die Glykogenmenge durch Polarisiren zugleich quantitativ bestimmt, und zwar in der wässerigen Lösung des Alkoholniederschlags. Zur Berechnung wurde die von mir zu $[\alpha]_D = 196,6^0$ ermittelte spec. Drehung benutzt.

Der Eiter stammt theils von Hunden, an denen durch Injection von (1—2 cbcm.) frisch rectificirtem Terpentinöl unter die Bauchhaut oder die Haut der Hinterschenkel aseptische Abscesse erzeugt wurden, theils von Kranken[1]).

Da man aus Blut eine zugesetzte Menge Glykogen nicht vollständig wieder gewinnt und das Glykogen aus dem Eiter im Princip nach demselben Verfahren dargestellt wurde, wie aus dem Blut, so lassen sich auch hier keine genauen Resultate erwarten; doch dürften die gewonnenen Zahlen immerhin Einiges über die Verhältnisse lehren, unter denen das Glykogen im Eiter auftritt.

Von allgemeiner Bedeutung sind folgende zwei Thatsachen.

Das Glykogen verschwindet aus dem Eiter ziemlich schnell, wie es scheint, mit dem Zerfall der Zellen. Dies lehrt eine Beobachtung, bei welcher sich in Eiter vom Hunde, den ich in dem 4fachen Volumen einer Steinsalzlösung von 0,6 % vertheilt, 4 St. hatte stehen lassen, auf 100 gr. nur 2,5 mgr. Glykogen fand, so ausserordentlich wenig gegenüber dem sonst reichlichen Gehalt des Eiters vom Hund an Glykogen (in 100 gr. 71 mgr. im Mittel, 22 mgr. im Minimum), dass die Annahme, es sei ein sehr grosser Theil des Glykogens verschwunden, auch ohne Vergleichsanalyse gerechtfertigt erscheint. Dieser Eiter enthielt am Ende des Versuchs nur noch sehr wenig unversehrte Zellen.

Von dieser Zerstörung des Glykogens im Eiter sind die vorliegenden Analysen entweder gar nicht oder doch nur wenig beeinflusst. Der Eiter von den Hunden wurde sofort nach der Entleerung aus den Abscessen

---

[1]) Dieses Material verdanken wir der chirurgischen Klinik, der Irrenklinik und der II. internen.

in Arbeit genommen, und der von Kranken sobald er ins Laboratorium gebracht wurde; auch in vielen dieser Fälle war er noch warm. Verdünnt wurde der Eiter nie stehen gelassen.

Als zweiter Punkt ist hervorzuheben, dass sich die Eiterzellen reicher an Glykogen erweisen, als das Eiterserum. Eiter aus einem 5 Tage alten Abscess beim Hunde liess sich durch 4stündiges Centrifugiren trennen in 113 gr. Serum und 170 gr. Cruor. Das Serum bestand aus einer oberen dünnen Schicht Fett, darunter fand sich eine braunrothe, wenig trübe Flüssigkeit und unter dieser eine vom Cruor nicht scharf abgegrenzte Schicht mit vorwiegend grossen, durch Jod färbbaren Zellen. Der Cruor enthielt viel geschrumpfte, aber auch noch grosse, durch Jod färbbare Zellen, zu unterst Blutcoagula; er war dickflüssiger als das Serum. In 100 gr. Serum fand sich 10,3 mgr., in 100 gr. Cruor 36,7 mgr. Glykogen.

Wenn man bedenkt, dass das Serum keineswegs frei war von Leucocyten, der Cruor viel schon zum Theil zerfallene Zellen und ausserdem ein seine Menge vergrösserndes Blutgerinnsel enthielt, so dürfte der Gehalt des Eiterserums gegenüber dem zellreicheren Antheil in Wirklichkeit noch geringer gewesen sein, als der Versuch ergab. Dazu kommt, dass sich dieser Eiter als glykogenarm erwies, offenbar desshalb, weil er erst mehrere Stunden nach der Eröffnung des Abscesses zur Untersuchung kam.

Aus den weiteren quantitativen Bestimmungen lassen sich noch folgende Sätze ableiten.

Die Menge, in welcher das Glykogen im Eiter aufgefunden wird, ist eine ungemein wechselnde. In 23 Proben Eiter vom Hund sind in 100 gr. (abgesehen von zwei Ausnahmsfällen mit nur Spuren Glykogen) 22—230 mgr., im Mittel 71,0 mgr. bestimmt worden, in 10 Proben Eiter vom Menschen Spuren bis 167 mgr., im Mittel 66,2 mgr.

Der Gehalt des Eiters an Glykogen ist von verschiedenen Umständen abhängig. Unter diesen tritt sehr deutlich der Einfluss hervor, welchen das Alter des Abscesses auf den Gehalt desselben an Glykogen ausübt.

Beim Hund waren die Abscesse in der Regel 4—6 Tage nach der Injection des Terpentinöls dem Durchbruch nahe und wurden desshalb zu dieser Zeit geöffnet; in einem solchen Abscess wurden in 100 gr. 88,6 mgr. Glykogen nachgewiesen. in einem anderen, 2 Tage älteren desselben Hundes dagegen 230,4 mgr. In diesem Falle wurde also in dem älteren Abscess erheblich mehr Glykogen gefunden, als in dem jüngeren, und es scheint darnach, dass das Maximum des Glykogengehalts erst nach einiger Zeit erreicht wird.

Ist diese Auffassung nur aus einer einzigen Beobachtung abgeleitet, so ergibt sich dagegen als sicher eine deutliche Abnahme an Glykogen, wenn die Abscesse über eine gewisse Zeit hinaus bestanden haben.

So wurde beim Hunde in 100 gr. Eiter 90,0 mgr. Glykogen gefunden, in dem Eiter aus einem den Tag darauf geöffneten Abscess 55,8 mgr.; in einem andern Fall bei einem Altersunterschied von gleichfalls einem Tag 161,3 und 56,0 mgr.; ferner im Eiter eines 4 Tage alten Abscesses 100,0 mgr. auf 100 gr. Eiter, im Eiter eines 7 Tage alten Abscesses desselben Hundes 29,0 mgr. Der Eiter stammt zwar von verschiedenen Körperstellen, die Abnahme des Glykogengehalts mit dem Alter ist jedoch sehr auffällig.

Noch beweisender in dieser Hinsicht sind die Erfahrungen an Eiter vom Menschen, weil hier zum Theil Abscesse zur Beobachtung kamen, welche viel älter waren als jene vom Hund. Aus einem Beckenabscess, der sich in 3—4 Tagen entwickelt hatte, wurden 3 Tage hinter einander erhebliche Mengen Eiter (270—370 gr.) entleert; in demselben wurde auf 100 gr. nachgewiesen 167,2, 161,7 und 123,0 mgr. Glykogen. Es zeigt sich auch hier wieder die Abnahme des Glykogengehalts mit dem Alter des Abscesses, und zwar an demselben Abscess. Der Glykogengehalt ist hier sehr gross, im Vergleich mit anderen gleichfalls frischen Fällen. So fand sich in zwei Fällen von schnell entstandener Phlegmone nur 56,8 und 77,6 mgr. Glykogen in 100 gr. Eiter und bei einer Osteomyelitis nach 9tägigem Bestand 72,6 mgr. Viel ärmer an Glykogen erwies sich dagegen der Eiter aus sehr alten Abscessen. Ein 4 Monate alter Senkungsabscess lieferte nur 2,8 mgr. Glykogen auf 100 gr. Eiter, eine 3 Monate alte tuberkulöse Rippencaries 0,41 mgr., eine 10 Wochen alte Coxitis nur Spuren, ein Senkungsabscess von Monate langem Bestand bei der ersten Entleerung 0,12 mgr., bei der zweiten Eröffnung, 23 Tage später, nur Spuren.

Mit der Dauer des Abscesses nimmt also der Gehalt des Eiters an Glykogen zweifellos ab und zwar so, dass im Eiter aus Abscessen von Wochen und Monate langem Bestand

selbst nur gerade noch auffindbare Spuren Glykogen nachweissbar sind.

Diese Unterschiede im Glykogengehalt sind wesentlich bedingt durch den verschiedenen Zellreichthum des Eiters. Leider ist von uns der Eiter nicht immer mikroskopisch auf seinen Gehalt an Zellen untersucht worden; nimmt man aber an, dass dicker Eiter auch viel Zellen enthält, so ergibt sich, dass aus zellreichem Eiter in der Regel erheblich mehr Glykogen gewonnen werden konnte, als aus zellarmem. In dickem Eiter wurden nämlich im Mittel aus 11 Bestimmungen auf 100 gr. gefunden 96,0 mgr. (39,2 bis 167,2 mgr.), in dünnflüssigem Eiter dagegen im Mittel aus 10 Bestimmuugen 30,1 mgr. (Spuren bis 155,2 mgr.), während im Mittel in 100 gr. Eiter überhaupt (vom Hund und Menschen) 69,5 mgr. nachgewiesen wurden.

Der Gehalt an Zellen kann aber nicht die einzige Ursache für den verschiedenen Gehalt des Eiters an Glykogen sein, denn die aufgestellte Regel ist nicht ohne Ausnahme. Unter den zellarmen Eiterproben fanden sich zwei mit 93,1 und 155,2 mgr. Glykogen in 100 gr. Eiter, also mit Mengen, welche dem mittleren Glykogengehalt zellreichen Eiters sehr nahe kommen und ihn selbst übertreffen. Umgekehrt fanden sich unter den zellreichen Eiterproben glykogenarme (zwei Fälle mit 29,0 und 39,2 mgr. Glykogen, einmal sogar nur Spuren). Wenn man als im Allgemeinen richtig gelten lässt, dass sich das Glykogen wesentlich in den Zellen des Eiters vorfindet, so lassen sich die erwähnten Abweichungen von der Regel durch die an sich verständliche Annahme erklären, dass auch die Zellen verschieden reich an Glykogen sein können. Betrachtet man die Zahl der durch Jod färbbaren Zellen und die Stärke dieser Färbung als Maass für den Glykogengehalt der Zellen, so findet die soeben ausgesprochene Annahme von dem verschiedenen Glykogengehalt der Zellen in den Thatsachen eine gute Stütze. In den 7 Fällen, in welchen beim Eiter vom Hund eine gute Jodreaction aufgezeichnet wurde, fand sich in 100 gr. Eiter im Mittel 74,2 mgr. Glykogen (32,0—155,2 mgr.), und unter

diesen fanden sich die zwei Fälle zellarmen Eiters mit 93,1 und 155,2 mgr.[1]).

Der sich durch Jod färbende Bestandtheil der Leucocyten ist jedoch nicht als reines Glykogen aufzufassen; er unterscheidet sich von diesem nach Czerny[2]) durch seine Schwerlöslichkeit in Wasser und durch die Eigenschaft, sich mit Jod und Schwefelsäure, sowie mit Methylviolett wie Amyloid zu färben.

Beziehungen zwischen dem Ernährungszustand des Individuums und dem Glykogengehalt des Eiters lassen sich, wie ich glaube, aus den vorliegenden Zahlen nicht ableiten, weil die Eiterproben ihres verschiedenen Alters wegen unter einander nicht vergleichbar sind. Dass aber solche Beziehungen bestehen mögen, ist nicht gerade unwahrscheinlich. Die oben erwähnten zwei Ausnahmefälle, in welchen nur Spuren Glykogen im Eiter gefunden wurden, betreffen einen Hund, dem zweimal hintereinander Terpentinöl injicirt wurde. Der Eiter aus dem ersten gegen 5 Tage alten Abscess war dickflüssig und erhielt nur Spuren Glykogen. Der zweite, 7 Tage nach dem ersten eröffnete Abscess lieferte auch einen dickflüssigen Eiter, gleichfalls nur mit Spuren Glykogen. Den Tag darauf war der Hund aus unbekannter Ursache in Agonie; er wurde durch Verbluten getödtet. In der sofort untersuchten Leber waren nur Spuren Glykogen anzutreffen, ein Beweis, dass sich das Thier in einem schlechten Ernährungszustand befunden hat. Dass das Glykogen des Eiters aus der Leber stammt, darf aus diesem Befund nicht gefolgert werden.

Die hier mitgetheilten Thatsachen bestätigen und erweitern einige ältere Angaben über das Vorkommen von Glykogen im Eiter.

Salomon[3]) fand in zahlreichen Versuchen an Hunden, denen durch subcutane Injection von faulem Blut Abscesse beigebracht waren, im Eiter fast regelmässig erhebliche Mengen Glykogen. In zwei Fällen chronisch verlaufender Abscesse beim Menschen wurde im Eiter gleich-

---

[1]) Die hier angegebenen Zahlen stimmen nicht genau mit den von Czerny, a. a. O. S. 205, mitgetheilten überein, weil Czerny weniger Fälle zur Verfügung hatte.

[2]) Czerny, a. a. O., S. 206, 209 und 212.

[3]) Salomon, Du Bois' Archiv, Bd. 2, S. 595, 1878 und Bd. 3, S. 159, 1879; Deutsche med. Wochenschr. 1877, Nr. 8; Centralbl. f. Physiologie, Bd. 6, S. 512, 1892.

falls Glykogen nachgewiesen, dagegen nicht in frischem Pleuraeiter. Auch in eitrigem oder schleimig eitrigem Sputuum fand sich Glykogen. Das Glykogen wurde erkannt an der Opalescenz der Lösung, der Färbung mit Jod, der Reduction von Kupferoxyd in alkalischer Lösung nach der Behandlung mit Schwefelsäure oder mit Speichel, und an der Rechtsdrehung.

Cramer[1]) bestimmte in dem zellenreicheren Antheil eines Empyemeiters auf 100 cbcm. 28 mgr. Glykogen.

Hierher gehört ferner die Beobachtung von Hoppe-Seyler[2]), der in Linsen, welche 8 Tage in der Bauchhöhle von Hunden verweilt hatten, neben zahlreichen Lymphzellen Glykogen antraf. — Der Ursprung des Glykogens, welches Kühne[3]) bei Pneumonie mit eitriger Infiltration in reichlicher Menge in der Lunge und Jaffé[4]) bei eitriger Meningitis in der Pia mater vorfanden, lässt sich gleichfalls auf die Gegenwart von Eiterzellen in diesen Geweben zurückführen.

Aus dem Vorkommen von Glykogen in den Eiterzellen auf einen Gehalt der Lymphzellen an Glykogen zu schliessen, ist nicht ohne Weiteres zulässig. Die Verhältnisse sind beim Eiter andere als bei der Lymphe. Czerny hat nachgewiesen, dass die aus dem Blut ausgewanderten Lymphzellen erst im Abscess die Substanz aufnehmen, welche mit Jod die Glykogenfärbung gibt. Eiter mit solcher Substanz ist, wie oben (S. 161) gezeigt wurde, im Allgemeinen reicher an Glykogen als anderer. Es hat also den Anschein, als ob das Glykogen der Eiterzellen aus dem zerfallenden Gewebe stamme. Gleichwohl muss auch den Lymphzellen ein Gehalt an Glykogen zugeschrieben werden; denn wiederholt ist schon in frischen lymphoiden Organen Glykogen aufgefunden worden und Lilienfeld[5]) hat in den Lymphzellen selbst Glykogen nachgewiesen; in den feuchten Lymphzellen bestimmte es Lilienfeld zu 0,092 %.

Das Verhalten des Glykogens im Blute.

Wenn das Glykogen einen Bestandtheil der Lymphzellen ausmacht, so lässt es sich auch im Blut erwarten. Was darüber bisher in bejahendem Sinne bekannt geworden ist, rührt von Salomon, sowie von Lépine und Barral her.

---

1) Cramer, a. a. O.
2) Hoppe-Seyler, Medic. chemische Untersuchungen 1871, S. 494.
3) Kühne, Virchow's Archiv, Bd. 32, S. 541, 1865.
4) Max Jaffé, Virchow's Archiv, Bd. 36, S. 24, 1866.
5) Lilienfeld, a. a. O.

Salomon[1]) gewann aus der Crusta granulosa von 6—7 Ltr. Pferdeblut eine sehr spärliche Menge Substanz, deren wässerige Lösung opalescirte und sich mit Jod roth färbte. — In zwei Fällen von Leukämie mit einem enormen Gehalte an weissen Blutkörperchen wurde aus Schröpfkopfblut Glykogen gewonnen. (Opalescirende Lösung, Färbung mit Jod, Rechtsdrehung, Verzuckerung durch Schwefelsäure). Ebenso gelang der Nachweis mit Aderlassblut von einem Rheumatiker, mit arteriellem Hundeblut und dem Blut zweier menschlicher Leichen 1½ und 9 St. nach dem Tode. In drei anderen Fällen fiel die Untersuchung von Aderlassblut negativ aus. Darnach ist nach Salomon's Ansicht das Glykogen vielleicht als normaler Bestandtheil des Blutes zu betrachten. — Frerichs[2]) berichtet, dass Salomon auch bei Diabetes im Blute Glykogen nachgewiesen habe, Salomon selbst erwähnt aber in seinem letzten späteren Berichte Nichts von einer solchen Beobachtung.

Lépine und Barral[3]) beschränken sich auf die kurze Angabe, dass man aus Blut, in welchem man die Glykolyse durch Erwärmen auf 58° unterdrückt habe, mittelst der Brücke'schen Methode leicht eine ziemlich beträchtliche Menge Glykogen isoliren könne. Die Autoren liessen das Blut auf Sand von der angegebenen Temperatur tropfen, können also schwerlich grosse Mengen Blut untersucht haben.

Unsere eigenen Untersuchungen erstrecken sich auf 31 Blutproben. In keinem derselben wurde das Glykogen vermisst. Vier von den Analysen bleiben aus dem Bericht weg, weil entweder zu wenig Blut in Arbeit genommen, oder das Filtrat vom Coagulum bei alkalischer Reaction eingekocht wurde, was nachweisslich die Ausbeute an Glykogen verringert. In den übrigen Fällen wurde auf 100 gr. Blut gesunder Thiere nachgewiesen:

	mgr. Glykogen:
Beim Schwein . .	0,691 (1 Fall),
» Schöps . .	0,114 (1 Fall),
» Pferd . . .	0,380 und 0,724,
» Rind . . .	0,767 (6 Fälle: 0,44—1,14),
» Kalb . . .	1,332 (6 Fälle: 0,89—2.14),
» Hund . . .	1,560 (3 Fälle: 1,05, 1,13 u. 2,50),
bei der Gans . . .	0,690 (1 Fall).

Im Blut des Hundes und des Kalbes fand sich also erheblich mehr Glykogen vor als im Blut anderer Thiere.

---

1) Salomon, Du Bois' Archiv, a. a. O.; Deutsche med. Wochensch. 1877, Nr. 8 und Nr. 45; Centralbl. f. Physiologie a. a. O.

2) Frerichs, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 6, S. 40, 1883.

3) Lépine und Barral, a. a. O.

Beim Hund hätte der grössere Gehalt an Glykogen daher rühren können, dass das Blut zum Theil durch arterielles Verbluten gewonnen wurde, und es wäre denkbar gewesen, dass die namentlich den letzten Antheilen Blut beigemischte Gewebsflüssigkeit den Glykogengehalt gesteigert hätte. Es wurde daher einem Hunde nur ein starker arterieller Aderlass gemacht. In diesem Blut fand sich auf 100 gr. 2,50 mgr., in dem anderen Blut dagegen nur 1,05 und 1,13 mgr. Das Verbluten erhöht demnach den Glykogengehalt des Blutes nicht. Vielleicht lässt sich der grössere Gehalt des Kalbs- und des Hundeblutes in anderer Weise erklären. Die Kälber waren Saugkälber und man könnte daher an die Möglichkeit denken, dass das Blut der Fleischfresser oder das Blut bei animalischer Nahrung reicher an Glykogen sei, als das der Herbivoren. Vielleicht enthält auch das Blut junger Thiere mehr Glykogen als das erwachsener.

Das Blut der gesunden Thiere enthielt, wie das gesunder Thiere überhaupt, keine durch Jod färbbaren Leucocyten. Vergleichsweise wurde noch das Blut von Hunden untersucht mit Leucocyten, die durch Jod färbbar waren; in solchem Blut fand sich im Mittel aus 6 Analysen 3,68 mgr. (2,26—7,33 mgr.) Glykogen auf 100 gr. Blut, also erheblich mehr als im Blut gesunder Hunde.

Die Fälle waren folgende. Bei zwei Hunden wurde beiderseits ein Pneumothorax angelegt, mit dem sie noch einige Tage lebten, ehe sie durch Verbluten getödtet wurden. In dem Blut des einen Hundes wurde auf 100 gr. Blut 2,26 mgr. Glykogen gefunden, aber wohl nicht die ganze Menge. Es hatte sich ein Blutgerinnsel gebildet, das in schwacher Lauge gelöst wurde, ein Verfahren, welches der Ausbeute an Glykogen abträglich ist. Der zweite Hund lieferte auf 100 gr. Blut 7,33 mgr. Glykogen, die grösste überhaupt zur Beobachtung gekommenen Menge; er hatte zugleich einen Terpentinölabscess, in dessen Eiter sich auf 100 gr. 59,1 mgr. Glykogen vorfand.

Bei zwei anderen Hunden wurde die Eiterung einige Monate lang unterhalten; es sind das die Hunde, bei welchen Czerny Amyloidentartung der Organe auffand. Bei dem einen derselben wurde in 100 gr. Blut 3,63, bei dem anderen 2,26 mgr. Glykogen bestimmt. Der eine der sehr herabgekommenen Hunde enthielt in der Leber nur wenig Glykogen, und in 100 gr. Eiter 39,2 mgr. Glykogen.

Ein Hund wurde unmittelbar nach der Spaltung des Terpentinölabscesses getödtet. In 100 gr. Blut fand sich 3,26 mgr. Glykogen, in 100 gr. Eiter 27,8 mgr., die Leber war reich daran. — Ein anderer Hund wurde 2 Tage nach der Entnahme von Eiter verbluten gelassen. Sein Blut enthielt in 100 gr. gleichfalls 3,26 mgr. Glykogen, der Eiter 93,14 mgr., die Leber viel.

In einem (siebenten) Fall wurden nur Spuren Glykogen im Blute bestimmt. Er betraf den schon S. 162 erwähnten Hund, der einen Tag nach Eröffnung des Abscesses in Agonie angetroffen wurde und in dessen Eiter und Leber gleichfalls nur Spuren Glykogen vorhanden waren. Dieser Fall ist in die obige Statistik der kranken Hunde nicht mit aufgenommen worden.

Aus diesen Untersuchungen darf also geschlossen werden, dass das Glykogen wirklich ein constanter Bestandtheil des Blutes ist; es gehört wahrscheinlich den Leucocyten an. Das Blut der Hunde und der Saugkälber enthält mehr Glykogen als das der Herbivoren. Gewebszerfall (beim Bestehen von Abscessen oder von andauernder hochgradiger Dyspnoe), in dessen Gefolge die sich durch Jod färbende Substanz in den Leucocyten auftritt, bedingt eine Vermehrung des Glykogens im Blute. Die eingangs aufgeworfenen Fragen werden also in bejahendem Sinne beantwortet.

Ueber die Ausnützung der Eiweissstoffe in der Nahrung in ihrer Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Nahrungsmittel.

Von

Ernst Krauss.

(Der Redaction zugegangen am 26. Juni 1893.)

Die Ausnützung des Eiweissgehalts eines Nahrungsmittels wurde bisher nach der Aufnahmefähigkeit des Darmes für die stickstoffhaltigen Verdauungsprodukte und nach den durch ihn dem Blut zugeführten Mengen derselben berechnet. Der Stickstoffverlust im Koth und der Stickstoffgehalt im Harn waren die massgebenden Grössen für die erreichte Ausnutzung und den im Körper stattgehabten Eiweissumsatz. Als Quelle des im Harn erschienenen Harnstoffs galt hauptsächlich das von der Darmschleimhaut resorbirte mehr oder weniger peptonisirte Nahrungseiweiss oder ein dieser Menge entsprechendes, dem Zerfall bestimmtes Maass von Organeiweiss.

Bekanntlich entstehen jedoch neben den gelösten Eiweissstoffen und Peptonen bei der Verdauung durch Trypsin im Dünndarm bei längerem Verweilen daselbst, besonders unter Mitwirkung der Fäulniss, noch weitere Zersetzungsprodukte des Eiweiss, so das Leucin, Tyrosin, die Asparaginsäure, Glutaminsäure, und ferner durch die Einwirkung der Fäulniss allein das Indol und Skatol, und aus dem Tyrosin neben Ammoniak die Phenole.

Neben den gelösten Eiweissstoffen werden auch diese Amidosäuren und aromatischen Körper vom Darm aus resorbirt. Soweit bekannt, findet eine rückläufige Vereinigung dieser Spaltungsprodukte zu höher stehenden, dem Eiweiss oder Pepton verwandten Atomgruppen nicht statt. Für die Beurtheilung der Eiweissresorption ist es daher von grosser

Bedeutung, zu wissen, ob das Eiweiss als peptonisirtes Eiweiss oder in seinen weitergehenden Zersetzungsprodukten aufgenommen worden ist, da ein Ersatz des Körpereiweiss wohl durch Peptone, aber nicht durch Amidosäuren und aromatische Körper möglich ist.

Die Menge des Harnstoffs gibt daher wohl einen Aufschluss über die Gesammtmenge des im Darm zersetzten Eiweisses, aber nichts Sicheres über die Menge des auch als Eiweiss resorbirten Antheils der Gesammtmenge, da von dieser die weiteren durch Trypsinwirkung und Fäulniss bedingten Spaltungsprodukte abgezogen werden müssen. Eine sichere direkte Bestimmung der Letzteren ist nicht möglich, kann aber schätzungsweise auf anderem Wege gewonnen werden.

Baumann's[1]) Untersuchungen zeigten, dass alle aromatischen Körper, die zum grössten Theil als gepaarte Schwefelsäuren im Harn auftreten, im normalen Körper ausschliesslich aus den Fäulnissprodukten der Eiweisse im Darm herstammen. Die Bestimmung der Aetherschwefelsäuren gibt uns also einen Anhalt für die Grösse der Darmfäulniss. Da nun die mit H_2SO_4 gepaarten Kresole und Phenole erst weitere Zersetzungsprodukte des durch Trypsin-Wirkung entstandenen Tyrosins sind, so muss bei vermehrter Kresol- und Phenolbildung auch eine grössere Menge von Tyrosin und der damit gleichzeitig entstehenden Amidosäuren gebildet worden sein. Umsoweniger sind wir in solchen Fällen berechtigt, den Stickstoffgehalt im Harn auf zerfallene Organbestandtheile zu beziehen, sondern müssen einen grösseren Theil desselben den im stärkeren Maasse gebildeten Amidosäuren zuschreiben.

Auch die Höhe des Indoxylgehaltes im Urin wird uns einen Maassstab für die Höhe der Eiweissfäulniss bieten, wenn auch grössere Schwankungen darin vorkommen und es überhaupt angezeigt erscheint, nicht nur die Vermehrung eines aromatischen Körpers, sondern diejenige ihrer Gesammtheit als Werthmesser in Betracht zu ziehen.

---

[1]) E. Baumann, Die aromatischen Verbindungen im Harn und die Darmfäulniss, Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. X, 1886, S. 123.

Die Spaltung der Eiweisskörper wird im Darm um so intensiver vor sich gehen, je mehr gelöste Eiweisssubstanz vorhanden ist, je stärker die Fäulniss wirkt und je langsamer die Resorption erfolgt. Durch die Höhe der Eiweisszufuhr können wir auf den ersten Faktor in bestimmender Weise einwirken. Der dritte ist im Allgemeinen einer direkten Messung nicht zugänglich und es bleibt die Frage offen, wie weit der zweite Faktor, die Fäulniss, durch Modifikation der Nahrung verringert oder vergrössert werden kann.

Hirschler[1]) hat experimentell nachgewiesen, dass durch Zusatz von Kohlenhydraten (Rohrzucker, Stärke), Glycerin, milchsauren Kalk u. s. w. in der Verdauung unterworfenen Fleischgemischen die Bildung der Fäulnissprodukte stark beeinträchtigt oder ganz aufgehoben wird. Er stellte gleichgerichtete Versuche an Hunden an und kam auch hier zu dem Resultat, dass durch die Vermischung der Fleischkost mit Kohlenhydraten die Menge des Indols und Phenols in den Fäces stark verringert, diejenige des Skatols auf 0 gesunken war. Er gab auf 250 gr. Fleisch 50 gr. Rohrzucker. Aehnliche Resultate erzielte er mit Stärke, Glycerin, Dextrin. Freilich hatten nicht alle Körper die gleiche fäulnisswidrige Kraft.

Das Verschwinden des Indoxyls aus dem Urin bei stickstoffarmer und kohlenhydratreicher Kost hat dann auch Ottweiler[2]) beobachtet und für die stärkere Indoxylbildung bei reiner Fleischkost die stärkere Fäulniss als Erklärung mit herangezogen.

Ausgehend von der bekannten Erfahrung, dass Milch keine Fäulnisserscheinungen zu zeigen pflegt, stellte Winternitz[3])

---

[1]) A. Hirschler, Ueber den Einfluss der Kohlenhydrate und einiger anderer Körper der Fettsäurereihe auf die Eiweissfäulniss, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. X, 1886, S. 306.

[2]) L. Ottweiler, Ueber die physiologische und pathologische Bedeutung des Indikans. Mittheil. aus d. Medic. Klinik zu Würzburg II, 1886, S. 153.

[3]) H. Winternitz, Ueber das Verhalten der Milch und ihrer wichtigsten Bestandtheile bei der Fäulniss, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XVI, 1892, S. 460.

eine Reihe von Untersuchungen an, die ihn unter Anderem zu folgenden Schlüssen führten:

1. Die Milch wirkt auf die Eiweissfäulniss hemmend ein und verzögert namentlich die Entstehung der letzten Eiweissspaltungsprodukte. Dieser Einfluss beruht auf der Gegenwart des Milchzuckers und macht sich unabhängig von der durch die Spaltung des Milchzuckers bedingten Säurewirkung geltend.

2. In derselben Weise und in demselben Umfange beeinflusst die Milch auch die Darmfäulniss und bewirkt einerseits eine entschiedene Verminderung der Aetherschwefelsäuren im Harn, andererseits das Fehlen, beziehungsweise die Verminderung der letzten Eiweissspaltungsprodukte in den Fäces, vermindert also dadurch den Zerfall der Eiweisssubstanzen in Produkte, welche für den Organismus werthlos, möglicherweise schädlich sind.

Kurz vor der Winternitz'schen Arbeit erschien eine Abhandlung von Biernacki[1]): Ueber die Darmfäulniss bei Nierenentzündungen und Ikterus nebst Bemerkungen über die normale Darmfäulniss. Er stellte seine Versuche an 5 verschiedenen Personen mit verschiedenen Diäten an. Bei Milchkost war trotz geringer Kohlenhydratzufuhr die Fäulniss (berechnet nach der H_2SO_4 im Harn) nicht so stark als bei Mittelkost, wo bei gleicher Eiweisszufuhr weit mehr Kohlenhydrate verzehrt wurden. Da bei den verschiedenen Kostarten ganz differente Nahrungsmittel gegeben wurden, so lassen diese mit den Winternitz'schen Ergebnissen nicht übereinstimmenden Versuche keine sichere Deutung zu.

Es erschien mir besonders wünschenswerth, die Frage, ob Kohlenhydrate die Eiweissfäulniss im Darm vermindern, weiterhin experimentell zu prüfen, zumal bei den Hirschler-schen Versuchen nur Koth- aber keine Harnbestimmungen stattgefunden haben, in den Winternitz'schen Experimenten nur Milch angewandt worden ist, die Methoden der Bestimmung besonders des wichtigsten Produktes der Darmfäulniss

---

[1]) E. Biernacki, Archiv f. klin. Medicin 49, 1892, S. 87.

der Eiweissstoffe des Indol, resp. des aus ihm gebildeten Indoxyl durch Obermeyer's Modifikation jetzt sichere Resultate in Aussicht stellte.

Ich liess einen Hund 6 Tage hungern, gab ihm dann 6 Tage lang je 500 gr. Fleisch und bestimmte die durchschnittliche Ausscheidung von gepaarter H_2SO_4 pro die und den Indoxylgehalt, setzte endlich für weitere 6 Tage zu der gleichen Fleischportion je 500 gr. Weissbrod und bestimmte wiederum die durchschnittliche Tagesausgabe von H_2SO_4 und Indoxyl.

Die Stickstoffbestimmungen im Harn wurden zum Theil nach der Argutinsky'schen[1]) Modifikation der Kjeldahlschen Methode ausgeführt. Es wurden 5 cbcm. des gleichmässig gemischten Tagesharnes mit 25 cbcm. einer Mischung von conc. Schwefelsäure und Phosphorsäureanhydrid nebst 0,2 gr. Quecksilberoxyd in besonderen Rundkolben aus hartem Glas so lange erhitzt, bis die Flüssigkeit farblos war. Darauf wurde sie in einen grösseren Kolben gespült, mit Natronlauge vom spec. Gewicht 1,25 schwach alkalisch gemacht, etwas Schwefelkaliumlösung zur Zerlegung des möglicher Weise gebildeten Quecksilberamides hinzugegeben und dann destillirt. Das Destillat wurde in einer abgemessenen Menge von $^1/_{10}$-Normal-Schwefelsäure aufgefangen. Nach beendigter Destillation wurde der nicht neutralisirte Rest der Schwefelsäure durch Titration mit $^1/_{10}$-Normal-Natronlauge ermittelt und so die in das Destillat übergegangene Menge Ammoniak festgestellt. Zur Bestimmung des Kothstickstoffs wurden 2—3 gr. des getrockneten und gleichmässig verriebenen Kothes angewandt, im Uebrigen wie oben verfahren.

In einigen Fällen wurde der Harn zur Bestimmung des Harnstoffs nach Liebig-Pflüger titrit.

Zur quantitativen Bestimmung des Indoxyls wurde eine colorimetrische Methode angewandt, deren Ausgangspunkt die Oxydation desselben zu Indigo war. Die Möglichkeit, durch eine solche genauere Resultate, als es bisher möglich war, zu

---

[1]) Archiv f. d. gesammte Physiologie, Bd. 46, S. 581.

erlangen, ist jetzt vorhanden, seitdem Obermayer[1]) ein Verfahren angegeben hat, durch welches eine zu heftige Oxydation, die zu Verlusten von Indigo führen kann, wie es bei der Chlorkalkmethode von Jaffé fast unvermeidlich ist, ausgeschlossen wird. Es wurde zu dem Zwecke der Harn zunächst mit Bleizuckerlösung gefällt, darauf das Filtrat mit dem gleichen Volumen rauchender Salzsäure, welche in 500 Theilen 2 Theile Eisenchlorid enthielt, versetzt und mehrere Minuten tüchtig umgeschüttelt. Das gebildete Indigo wurde dann mit Chloroform aufgenommen und mit einer Normallösung verglichen. Dieselbe wurde theils mit einem Präparat hergestellt, das zwar Indigoroth enthielt, aber so lange mit heissem Alkohol ausgewaschen wurde, bis das Filtrat keine Spur von rother Farbe mehr zeigte, theils mit einem von Kahlbaum in Berlin bezogenen besonders guten Präparat dargestellt. Ihr Gehalt wurde an einem Theil der Lösung durch Verdampfen des Chloroforms und Wägen des Rückstandes ermittelt. Zum Vergleich der aus dem Harn gewonnenen Indigolösung mit der Normallösung wurden beide in zwei mit planparallelen Wandungen versehenen Glasgefässe von ganz genau gleicher Dicke gefüllt. Zur feineren Wahrnehmung der Farbenunterschiede wurden sie überdies auf einen Bogen von weissem Papier gestellt. Die Harnindigolösung wurde dann so lange verdünnt, bis sie dieselbe Farbennuance wie die Normallösung zeigte und so ihr Gehalt an Indigo festgestellt.

Die Menge der gepaarten Schwefelsäure wurde nach Baumann[2]) bestimmt. In einem abgemessenen Volumen Harn wurde die nicht gepaarte Schwefelsäure durch Chlorbaryum gefällt. Im Filtrat wurde die gepaarte Schwefelsäure durch Kochen mit Salzsäure zerlegt und die nun freigemachte Schwefelsäure wieder mit Chlorbaryum gefällt. Das gebildete Baryumsulfat schliesslich im Platintigel geglüht und gewogen und aus seiner Schwefelsäure die Quantität der gepaarten Schwefelsäure des Harnes berechnet.

---

[1]) Wiener Klin. Wochenschr. 1890, S. 176.

[2]) Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. 1, S. 70.

Reihe A.

Tabelle I.

Versuchstag.	Gewicht des Hundes.	Harn-Volumen.	Harn. Spez. Gew.	N im Harn.	Indigo im Harn.	Gepaarte H_2SO_4.	Koth. Gewicht.	N in Koth.
I.	12450	80	1050	10,62	0,0027	0,041	—	—
II.	—	0	—	—	—	—	—	—
III.	—	207	1032	5,46	0,0151	0,090	—	—
IV.	—	0	—	—	—	—	frisch 72, trock. 22	1,404
V.	—	50	1060	3,46	Grüne Farbe	—	—	—
VI.	10900	90	1070	8,93	Grüne Farbe	0,0245	—	—
	1550 Abnahme.	427		28,47	0,0178	0,1555		1,404

Beginn: 22. XI. 92 Morgens 8 Uhr.
Ende: 28. XI. 92 Morgens 8 Uhr.
6 Tage Hunger.

Tabelle II.

Versuchstag.	Gewicht des Hundes.	Harn-Volumen.	Harn. Spez. Gew.	N im Harn.	Indigo im Harn.	Gepaarte H_2SO_4.	Koth. Gewicht.	N in Koth.
I.	10900	0	—	—	—	—	—	—
II.	—	195	1068	10,97	0,0130	0,0356	—	—
III.	—	410	1064	25,05	0,0548	0,2185	—	—
IV.	—	205	1065	10,49	0,0283	0,1405	—	—
V.	—	337	1063	17,50	0,0764	0,2224	—	—
VI.	12004	310	1053	14,84	0,0853	0,1897	fr. 52, tr. 28,5	2,96
	1104 Zunahme.	1457		78,85	0,2578	0,8067		2,96

Beginn: 28. XI. 92 Morgens 8 Uhr.
Ende: 4. XII. 92 Morgens 8 Uhr.
6 Tage je 500 gr. Fleisch.

Ausscheidung von gepaarter H_2SO_4 pro die = 0,1613 gr.
» » Indigo . » » = 0,0506 »

Gesammtstickstoffeinnahme in 6 Tagen = 6 × 17 gr. . 102 gr. N.
Ausgabe » 6 » (Harn u. Koth) . 81,81 gr. N.

Zurückbehalten . 20,19 gr. N.

Tabelle III.

Versuchstag.	Gewicht des Hundes.	Harn-Volumen.	Harn. Spez. Gew.	N im Harn.	Indigo im Harn.	Gepaarte H_2SO_4.	Koth. Gewicht.	N im Koth.
I.	12004	324	1065	15,658	0,0732[1]	0,1425	—	—
II.	—	182	1064	9,077	0,0033	0,0417	fr. 33 / tr. 19,8	4,5936
III.	—	485	1038	16,068	0,0178	0,1372	—	—
IV.	—	880	1026	14,219	0,0233	0,1848	—	—
V.	—	595	1033	15,517	0,0329	0,1065	fr. 91,5 / tr. 16,14	0,849
VI.	14450	425	1053	16.321	0,0036	0,0845	fr. 86,5 / tr. 17,34	1,638
	2446 Zunahme.	2891		86,860	0.1541	0,7472		7,0806

Beginn: 4. XII. 92 Morgens 8 Uhr.
Ende: 10. XII. 92 Morgens 8 Uhr.
Täglich 500 gr. Fleisch und 500 gr. Weissbrod.

6 × 500 gr. Fleisch = 6 × 17 gr. = 102 gr. N.
6 × 500 gr. Brod = 6 × 9,8 gr. = 58,8 gr. N.

Gesammteinnahme . . . . 160,80 gr. N.
Gesammtausgabe in Harn und Koth 93,94 gr. N.

Zurückbehalten . . . . 66,86 gr. N.

Ausscheidung von gepaarter H_2SO_4 pro die = 0,1246 gr.
» » Indigo » » = 0,0257 gr.

Aus dem Vergleich der Tabelle II und III ergibt sich, dass bei reiner Fleischnahrung die tägliche Ausfuhr von gepaarter H_2SO_4 und Indikan viel grösser ist, als bei gleichzeitiger Kohlenhydratzufuhr.

	II.	III.
H_2SO_4:	0,1613	0,1246
Indigo:	0,0516	0,0257.

Mithin sind auch die Fäulnissprocesse bei reiner Fleischkost viel intensivere gewesen. Demensprechend muss die Menge des als Pepton resorbirten Eiweisses eine geringere

[1]) Offenbar in der Höhe noch beeinflusst von der Ernährung in den vorausgegangenen Tagen.

gewesen sein, als im Falle III. Die Tabellen zeigen, dass thatsächlich die Verwerthung des Eiweisses bei reiner Fleischkost eine geringere war. Von 102 gr. eingeführten N wurden 20,19 gr. zurückbehalten, also ungefähr $^1/_5$, während bei gemischter Kost von 160,8 gr. eingeführten N 66,86 gr., d. h. fast die Hälfte, angesetzt wurden.

Die bessere Verwerthung des N geschieht aber nicht durch eine bessere Resorption des im Falle III zugeführten Pflanzeneiweisses, da wir aus Rubner's[1]) Untersuchungen wissen, dass die Ausnutzung des N im Weissbrod nur eine geringe ist. So bleibt keine andere Annahme übrig, als die, dass durch Beifügung der Kohlenhydrate eine grössere Verwerthung des im Fleisch enthaltenen N und zugleich eine Verminderung der Eiweissfäulniss und Eiweisszersetzung stattgefunden hat. Ob dieser letzte Umstand den ersten, die grössere Ausnutzung des N, allein erklären kann, oder ob andere Faktoren noch dabei mitspielen, bleibt dahingestellt. Jedenfalls müsste der Grad der Eiweissfäulniss bei allen Stoffwechselversuchen in erster Linie mit in Betracht gezogen werden.

Die Thatsache, dass selbst bei geringem gleichbleibenden Eiweissgehalt der Nahrung durch reichlichere Zuführung von Kohlenhydraten ein höherer N-Ansatz erzielt werden kann, ist schon von Anderen, darunter Rubner[2]), Munk[3]), Kumagawa[4]) festgestellt worden. Letzterer konnte an sich selbst, nachdem bei einer täglichen Gabe von 58,102 gr. Eiweiss (davon 46,73 resorbirt) und 441,688 gr. Kohlenhydraten (davon 418,12 gr. resorbirt) eine N-Ausgabe von 10,507 gr. pro die stattgefunden hatte, in einer weiteren Versuchsreihe, bei der 50,50 gr. Eiweiss (davon 37,8 gr. resorbirt) und 560,832 gr.

[1]) M. Rubner, Ueber die Ausnützung einiger Nahrungsmittel im Darmkanale des Menschen, Zeitschrift für Biologie, Bd. XV, S. 115.

[2]) L. c., S. 146.

[3]) J. Munk, Die Fettbildung aus Kohlehydraten beim Hunde, Virchow's Arch. 101, 1885, S. 107.

[4]) M. Kumagawa, Vergleichende Untersuchungen über die Ernährung mit gemischter und rein vegetabilischer Kost mit Berücksichtigung des Eiweissbedarfs, Virchow's Arch. 116, 1889, S. 370.

Kohlenhydraten (davon 566,19 resorbirt) gegeben wurden, eine tägliche Durchschnittszunahme von 0,653 gr. N erzielen.

Durch diese Versuche wurde die schon früher, in letzter Zeit besonders von Hirschfeld[1]) aufgestellte Behauptung, dass entgegen der Voit'schen Ansicht eine geringere Eiweissaufnahme als 118 gr. pro die bei entsprechender Kohlenhydratzufuhr vollständig zur Erhaltung des Stickstoffgleichgewichts genüge, wesentlich gestützt. Voit hat mit Recht seinem hohen Eiweissansatz auch einen entsprechend hohen Ansatz von Kohlenhydraten zugesetzt. Wird das Eiweiss in der Nahrung einseitig vermehrt, wie es von manchen Seiten angestrebt wird, in der Hoffnung, dadurch den Werth der Nahrung zu heben, so müsste erst untersucht werden, ob dieses vermehrte Eiweiss auch als solches resorbirt wird oder nicht stärkeren Fäulnisszersetzungen unterliegt, wodurch der Werth der Vermehrung hinfällig und der Körper durch die reichliche Anwesenheit von Fäulnissprodukten nur geschädigt würde.

Meine Versuche sprechen deutlich für die Richtigkeit letzterer Annahme.

Schon Rubner[2]) betont, dass bei reiner Fleischkost Ermüdungsgefühle, besonders in den unteren Gliedmassen, bei den Versuchspersonen auftraten.

Es folgt daraus, dass das Eiweiss nicht unnöthig in grosser Menge gegeben werden soll und dass bei Krankheiten, in denen die Kohlenhydrate beschränkt werden müssen, wie bei der Fettleibigkeit und dem Diabetes (Ebstein[3]) die Menge des eingeführten Eiweisses und die S-Ausscheidung im Harn noch keine Gewähr für die wirkliche Verwerthung des Eiweisses gibt.

Dass hierin das von Ebstein besonders empfohlene, von Hundhausen in Hamm i. W. hergestellte Pflanzen-

---

[1]) F. Hirschfeld, Untersuchungen über den Eiweissbedarf des Menschen, Pflüger's Archiv 41, 1887, S. 583; Beiträge zur Ernährungslehre des Menschen, Virchow 114, 1888, S. 301; Betrachtungen über die Voit'sche Lehre von dem Eiweissbedarf des Menschen, Bonn 1889.

[2]) Rubner l. c.

[3]) E. Ebstein, Ueber die Lebensweise der Zuckerkranken, Wiesbaden 1892, Bergmann.

eiweiss, das Aleuronat sich von dem animalischen nicht unterscheidet, beweist folgende Versuchsreihe:

Reihe B.

Tabelle I.

Versuchstag.	Gewicht des Hundes.	Harn-Volumen.	Harn. Spez. Gew.	N im Harn.	Indigo im Harn.	Gepaarte H_2SO_4.	Koth. Gewicht.	N im Koth.
I.	16220	—	—	—	—	—	—	—
II.	—	145	1065	7,086	0,0157	0,0126	—	—
III.	—	—	—	—	—	—	—	—
IV.	—	140	1072	7,111	0,0566	0,1176	—	—
V.	—	—	—	—	—	—	—	—
VI.	13450	27	1083	2,400	0,0158	0,0220	—	—
	2770 Abnahme.			16,597	0,0881	0,1522		

Beginn: 6. II. 93 Morgens 9 Uhr.
Ende: 12. II. 93 Morgens 9 Uhr.
6 Tage Hunger.

Ausscheidung der H_2SO_4 pro die = 0,0507 gr.
» des Indigo » » = 0,0294 gr.

Tabelle II.

Versuchstag.	Gewicht des Hundes.	Harn-Volumen.	Harn. Spez. Gew.	N im Harn.	Indigo im Harn.	Gepaarte H_2SO_4.	Koth. Gewicht.	N im Koth.
I.	ca. 12900	80	1060	3,360	0,0144	0,1060	—	—
II.	—	395	1052	11,822	0,0284	0,2263	fr. 125 tr. 50	3,92
III.	—	485	1047	11,407	0,0348	0,2621	—	—
IV.	—	285	1053	7,501	0,0490	0,1539	—	—
V.	—	225	1070	8,920	0,0640	0,1732	—	—
VI.	14000	580	1049	14,840	0,0560	0,1647	fr. 95 tr. 23,75	1,91
	1100 Zunahme.			55,850	0,2467	1,0862		5,83

Beginn: 15. II. 93 Morgens 9 Uhr.
Ende: 21. II. 93 Morgens 9 Uhr.

Täglich reines Aleuronat (105 gr.) und Fleischextract (10 gr.) = 15,52 + 0,84 = 16,36 gr. N.

Stickstoffaufnahme in 6 Tagen = 98,16 N.
Ausgabe in Harn und Koth = 61,68 N.

Zurückbehalten = 37,48 N.

Die Ausscheidung der gepaarten H_2SO_4 pro die = 0,1810 gr.
» » des Indigo » » = 0,0311 gr.

Tabelle III.

Versuchstag.	Gewicht des Hundes.	Harn-Volumen.	Harn. Spez. Gew.	N im Harn.	Indigo im Harn.	Gepaarte H_2SO_4.	Koth. Gewicht.	N im Koth.
I.	14000	415	1053	14,640	0,05776	0,2615	—	—
II.	—	110	1050	3,633	0,01660	0,0908	—	—
III.	—	380	1045	10,534	0,02736	0,0660	—	—
IV.	—	180	1038	4,731	—	0,0432	fr. 95 / tr. 29,5	1,234
V.	—	505	1042	13,008	—	0,0740	—	—
VI.	15500	106	1038	2,058	—	0,0120	—	—
	1500 Zunahme.			48,604	0,09172	0,5475		1,234

Beginn: 21. II. 93 Morgens 9 Uhr.
Ende: 27. II. 93 Morgens 9 Uhr.

Täglich 480 gr. Aleuronatbrod = 16,71 gr. N.

Einnahme an N in 6 Tagen = 100,26 gr.
Ausgabe in Harn und Koth = 49,84 gr.

Zurückbehalten = 50,42 gr. N.

Die Ausscheidung der gepaarten H_2SO_4 betrug pro die = 0,0902 gr.
» » des Indigo » » » = 0,0305 gr.

Zu diesen Versuchen sei Folgendes bemerkt. Zwischen dem I. und II. Versuch liegen 3 Tage, an welchen vergeblich versucht wurde, reines Aleuronat dem Hunde beizubringen. Er frass dasselbe erst bei Zusatz von Fleischextract.

Die Stickstoffbestimmung für reines Aleuronat ergab für 105 gr. = 15,52 gr. N.

In dem von einem Strassburger Bäcker bezogenen Aleuronatbrod (387 gr. frisch = 263,87 gr. trocken) enthielten

100 gr. trockenen Brodes = 28 gr. Aleuronat = 20,02 gr. Eiweiss.
77 gr. Weizen = 10,78 gr. Eiweiss.

Das Brod wurde frisch verfüttert.

Das Verhältniss der Ausscheidung von gepaarter H_2SO_4 für die Versuche II und III stellt sich folgendermaassen dar:

$$\left.\begin{array}{l} II = 0{,}1810 \text{ gr.} \\ III = 0{,}0912 \text{ gr.} \end{array}\right\} = 2 : 1.$$

Diese Versuche lehren, dass reines Aleuronat bezüglich seiner Ausnutzung gegenüber der gemischten Kost im Aleuronatbrod sehr im Nachtheil ist.

Bei ungefähr gleicher Eiweisszufuhr wurden im Versuch II nur 38,18 % N, im Versuch III dagegen 50,28 % N zurückbehalten. Umgekehrt betrug die Summe der im Falle II ausgeschiedenen H_2SO_4 das Doppelte wie im Falle III.

Erhöhte Eiweissfäulniss geht daher mit geringerer Eiweissausnutzung Hand in Hand. Die Eiweissfäulniss wird verringert und die Ausnutzung des Eiweiss bei gleicher N-Zufuhr gefördert durch die Zufügung von Kohlenhydraten.

Wenn daher bei der Herstellung von Gebäcken für Diabetiker ein möglichst hoher Eiweissgehalt erstrebt wird (50—55 % und darüber), so müssen erst weitere Untersuchungen lehren, ob der dann noch verbleibende Rest von Kohlenhydraten genügt, um stärkere Fäulniss zu verhindern, die erstens den Nutzen der vermehrten Eiweisszufuhr illusorisch machen, zweitens die Ueberladung des Körpers mit Zersetzungsprodukten zur Folge haben würde.

Meine Versuche zeigen, dass das Bestreben, den Eiweissgehalt einer Nahrung im Verhältniss zu den Kohlenhydraten einseitig zu steigern, von keinem Erfolge gekrönt sein kann, weil dadurch nur der Darmfäulniss Vorschub geleistet wird.

Zum Schluss sei es mir gestattet, Herrn Professor Dr. Hoppe-Seyler für die freundliche Anregung und reiche Unterstützung bei der Arbeit meinen herzlichen Dank zu sagen.

Den 25. Juni 1893.

Ernst Krauss, cand. med.

Zur Frage nach dem Nährwerth der Albumosen.

Von

Dr. med. H. Hildebrandt in Elberfeld.

(Der Redaction zugegangen am 28. Juni 1893.)

In einer früheren Arbeit[1]) habe ich bereits über einige orientirende Thierversuche bezüglich des Nährwerthes eines Albumosen-Präparates[2]) Mittheilung gemacht; in Folgendem soll gleichsam als Ergänzung über einige inzwischen gewonnene Ergebnisse berichtet werden.

Es erschien werthvoll, einen exacten Stoffwechselversuch am gesunden Menschen auszuführen, um gleichzeitig zu erfahren, wie bei Ersatz einer grösseren Menge Fleisch-N durch Albumosen-N das subjective Befinden der Versuchsperson beeinflusst würde.

Als Versuchsperson diente ein im 28. Lebensjahre stehender Mann, muskulös und ohne Fettpolster, dabei als zuverlässig bekannt.

Der Stoffwechselversuch begann mit einer 5tägigen Fleisch-Fett-Kohlehydrat-Periode; hierauf folgte eine 3tägige Periode, in welcher 28,37 % Eiweiss-N (des Fleisches), alsdann

---

[1]) Verhandlungen des XII. Kongresses für Innere Medizin zu Wiesbaden (April 1893).

[2]) Zu den Versuchen benutzte ich ein in den Farbenfabriken vorm. Fr. Bayer u. Co. hergestelltes Präparat, welches wesentlich aus Deutero- und Heteroalbumosen besteht; es gelangt als «Somatose» in den Handel.

eine 2tägige, in der 63,88 % Eiweiss-N (des Fleisches) durch eine äquivalente Menge Albumosen ersetzt wurden. In einer darauffolgenden 4. Periode wurden die Bedingungen der ersten Fleischperiode wiederhergestellt.

Alles Nähere ergeben die folgenden Tabellen.

I. Speisezettel.

		Stickstoff aus: Eiweiss.	Extract	Gesammt.	Fett.	Kohlehydrat.	Alkohol.	Bemerkungen.
Morgens ½9 Uhr.	100 gr. Weissbrod	0,924	—	0,924	1,0	55,625	—	Jeden Tag verrichtete die Versuchsperson dieselbe Muskelarbeit, bestehend in einem mehrstündigem Spaziergang.
	100 gr. Schwarzbrod	1,133	—	1,133	—	55,01	—	
	25 gr. Butter	0,178	—	0,178	20,0	—	—	
	61 gr. Schinken	2,562	—	2,562	2,20	—	—	
Mittags 12 Uhr.	500 cbcm. Suppe	—	0,525	0,525	7,50	25,00	—	
	200 gr. Fleisch	6,08	0,520	0,600	0,90	—	—	
	75 gr. Reis	0,75	—	0,75	0,70	58,20	—	
Abends ½7 Uhr.	100 gr. Weissbrod	0,924	—	0,924	1,0	55,625	—	
	100 gr. Schwarzbrod	1,133	—	1,133	—	55,01	—	
	25 gr. Butter	0,178	—	0,178	20,0	—	—	
	100 gr. Schinken	4,200	—	4,200	3,60	—	—	
	2 Flaschen (950 cbcm.) Bier	1,900	—	1,900	—	34,311	28,5	
	50 cbcm. Cognac	—	—	—	—	—	20	
	450 cbcm. Milch	2,025	—	2,025	15,75	20,25	—	
	Kaffee aus 15 gr. Bohnen	—	0,377	0,377	—	—	—	
	Sa.	21,987	1,422	23,409	72,65	359,05	48,5	

II. Ernährungsversuch.

a) Einnahmen. — **Ausgaben.**

Dat.	Stickstoff. Eiweiss.	Stickstoff. Extr.	Stickstoff. Gesammt.	Fett.	Kohlehydrate.	Alkohol.	Calor.	Körpergewicht.	Harn. Menge.	Harn. Sp. Gew.	Harn. % N.	Harn. gr. N.	Koth. Menge trocken.	Koth. % N.	Koth. gr. N.	N in Harn u. Koht.	Bilanz. +	Bilanz. —
4. Mai	21,987	1,422	23,41	72.65	359,05	48,5	3050,65	67,250	2015	1,025	0,78	15,72	49,0	4,31	2,11	17,83	5,58	—
5. »	»	»	»	»	»	»	»	—	1885	1,0225	0,84	16,78	84,0	4,20	3,53	20,31	3,10	—
6. »	»	»	»	»	»	»	»	—	2330	1,020	0,83	19,34	35,0	3,62	1,27	20,61	2,80	—
7. »	»	»	»	»	»	»	»	—	2360	1,0175	0,708	16,71	55,0	5,88	3,23	19,94	3,47	—
8. »	»	»	»	»	»	»	»	67,250	2200	1,0195	0,815	17.93	72,0	5,21	3,75	21,68	1,73	—
									2194 pr. die.			17,69 p. d.	61,5 p. d.		2,95 p. d.	20,64 p. d.	2,78 p' d.	
b) Ersatz des Fleisches durch 49,9 gr. Albumosen und 6,7 gr. Fleisch-Extract.																		
9. »	22,307	1,422	23,73	72,65	35,905	48,5	3050,65	67,250	1810	1,020	0,725	13,12	87,0	7,04	6,12	19,24	4,49	—
10. »	»	»	»	»	»	»	»	—	1990	1,019	0.88	17,51	68,0	7,68	5,22	22,73	1,00	—
11. »	»	»	»	»	»	»	»	67,800	1670	1.0205	0,90	15,03	90,0	8,86	7,92	22,96	0,77	—
									1820 p. d.			15,22 p. d.	01,5 p. d.		6,42 p. d.	21,64 p. d.	2,09 p. d.	—
c) Ersatz des Fleisches und des Schinkens durch 103,5 gr. Albumose und 6,7 gr. Fleisch-Extract.																		
12. »	22,524	1,422	23,946	72,65	35,905	48,5	3050,65	67,800	1600	1,019	0,93	14,88	116,0	8,4	9,74	24,62	—0,67	—
13. »	»	»	»	»	»	»	»	68,000	1900	1,017	0,765	14,54	82.0	7,55	6,19	20,73	3.22	—
									1750 p. d.			14,71 p. d.	99,0 p. d.		7.97 p. d.	22,68 p. d.	1,27 p. d.	—
d) Herstellung der Versuchsbedingungen wie in Periode „a“ (4. bis 8. Mai).																		
14. »	21,987	1,422	23,41	72,65	35,905	48,5	3050,65	68,000	2000	1,019	0,825	16,50	72,0	4,5	3,96	20,46	2,95	—
15. »	»	»	»	»	»	»	»	—	1850	1,02	0,89	16,47	73,0	4,15	3,03	19,50	3,91	—
16. »	»	»	»	»	»	»	»	—	1850	1,020	0,955	17,61	25,0	5,12	1,28	18,95	4,46	—
17. »	»	»	»	»	»	»	»	—	2230	1,019	0,78	17.39	38,0	5,04	1,92	19,31	4,10	—
18. »	»	»	»	»	»	»	»	67,700	2275	1,021	0,83	58,88	72,0	4,17	3,00	21,88	1,53	—
									2041 p. d.			17,38 p. d.	56,0 p. d.		2,64 p. d.	20,02 p. d.	3,39 p. d.	—

Aus den Zahlen ist ersichtlich, dass die Quantität des täglich durchschnittlich ausgeschiedenen Harnes während der Albumosenperiode abgenommen hat; seine Concentration ist in derselben Periode höher als in den anderen. Die Gesammt-N-Ausscheidung im Harn war durchschnittlich pro die

in Serie I . . . . 17,69 N[1]),
in Serie II . . . . 15,22 N,
in Serie III . . . . 14,71 N,
in Serie IV . . . . 17,38 N.

Es ergibt sich somit ein Minus von 2,47 bis 2,98 pro Tag in den Albumosenperioden. Auffallend ist ferner die grössere N-Ausscheidung durch den Koth in Periode II und III, nämlich 6,42 bezw. 7,97 pro die gegenüber 2,95 bezw. 2,64 in den beiden Fleischperioden. Seine Consistenz war etwas breiig, aber durchaus nicht diarrhoisch.

Die N-Bilanz betrug

in den Albumosenperioden 2,09 bezw. 1,27 pro die,
in den Fleischperioden . 2,78 bezw. 3,39 pro die.

Es hatte somit in den Albumosenperioden ein etwas geringerer N-Ansatz stattgefunden als in den Fleischperioden.

Zieht man indess den durchschnittlich pro Tag im Koth abgeschiedenen N — ein gewisser Theil wurde im Koth der Albumosenperioden als unresorbirte Albumosen erkannt — vom N der Einfuhr ab, so ergibt sich folgende Tabelle:

	Zur Resorption gelangter Stickstoff.	Bilanz.	Bilanz in Procent des resorbirten N.
Serie I. . . .	20,46	+ 2,77	13,45
Serie II. . . .	17,31	+ 2,09	12,07
Serie III. . . .	15,976	+ 1,27	7,95
Serie IV. . . .	20,77	+ 3,39	16,33

Ein Vergleich der N-Bilanz mit dem gesammten (zur Resorption gelangten) N ergibt, wie viel vom gesammten resorbirten N im Organismus zum Ansatz gelangte.

[1]) In Serie I wurde Tag 1 (4. Mai) wegen seines durch den Uebergang in reichliche Ernährung bedingten abnormen Verhaltens unberücksichtigt gelassen.

Mit den gefundenen Werthen der N-Bilanz geht aber das Körpergewicht der Versuchsperson nicht parallel; vielmehr bleibt während der ersten Fleischperiode ihr Gewicht das gleiche (67,250 Kg.), in den Albumosenperioden steigt es auf 67,800 bezw. 68,000 Kg., um im Laufe der folgenden Fleischperiode wiederum auf 67,700 Kg. zu sinken. Wiewohl also der Organismus in den Albumosenperioden eine geringere Menge N-haltiges Material zurückbehält, erfährt er doch an Gewicht noch einen Zuwachs. Es wäre denkbar, dass hieran eine bessere Ausnutzung der Kohlehydrate einen Antheil habe; es konnte dieser Frage durch Bestimmung der Gesammtmenge der im Kothe ausgeschiedenen Kohlehydrate näher getreten werden; doch wurde dies unterlassen, da die Frage nur secundäres Interesse bot. Am nächsten liegt die Annahme, dass die Albumosen einen höheren Werth repräsentiren als die N-haltigen Bestandtheile des Fleisches. Diese Deutung wird auch gestützt durch die Angabe der Versuchsperson, dass sie sich kräftiger und gesättigter fühle als in der vorangegangenen Periode; in der letzten Fleischperiode machte sich hingegen ein Gefühl der Mattigkeit geltend.

In einer neuerdings aus Hoppe-Seyler's Laboratorium hervorgegangenen Arbeit berichtet Adrian[1]) auf Grund von Versuchen an einer Hündin, dass das gleiche Quantum N-haltiger Nahrung, in mehreren kleinen Portionen des Tags über gereicht, für den Organismus einen höheren Werth hat (das Körpergewicht erhöht) als die einmal gereichte ganze Nahrung. Die Erklärung hierfür ist: dass «die durch die Verdauung gelösten Eiweisstheilchen bis zur Resorption kürzere Zeit im Darmkanale verweilen und somit der weiteren Einwirkung der Pankreasflüssigkeit und Fäulniss im Darmkanal weniger ausgesetzt sind. Die Ausnutzung der Eiweissstoffe im Organismus ist nur dann eine möglichst vollständige, wenn möglichst wenig vom eingeführten Eiweiss durch Pankreaswirkung und Fäulniss der Spaltung unterliegt, also als solches (Acidalbumin, Propepton, Pepton) zur Resorption gelangt».

[1]) Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. XVII, Heft 6.

Wie es scheint, gelangt bei der erwähnten Versuchsanordnung das N-haltige Material in der für die Assimilationsverhältnisse am meisten geeigneten Form zur Resorption (als Albumosen?) und es liegt nahe, auch die von uns beobachtete Gewichtszunahme bei Ersatz eines grösseren Theils von Fleisch-N durch Albumosen darauf zurückzuführen, dass die Albumosen im Wesentlichen als solche zur Resorption gelangt sind, ohne der Pankreaswirkung oder Fäulniss unterlegen zu haben.

Es spricht in der That auch manches dafür, dass bereits im Magen eine Resorption gelöster Eiweissstoffe statt hat; v. Mering[1]) zeigte neuerdings, dass Lösungen von Witte'schem Pepton aus der Pylorusfistel gastrotomirter Hunde in geringerer Concentration abliefen, dass somit ein Theil resorbirt war.

Bezüglich des Verhaltens der Albumosen in dieser Beziehung habe ich einige Versuche am Kaninchen, denen der Pylorus abgebunden war, angestellt. Nach Eingabe von 5 gr. Albumosen (in Lösung) per Schlundsonde erschienen im Harn geringe Mengen unveränderter Albumosen sowie etwas Pepton. Bei Verabreichung von nur 2 gr. Albumosen waren im Harn weder Albumosen noch Pepton nachweisbar. Zwei Kaninchen gleicher Grösse und gleichen Wurfes, die längere Zeit auf gleiche (Hafer-)Diät gesetzt waren, wurde der Pylorus unterbunden; alsdann erhielt das eine 2 gr. Albumosen (40 cbcm. 5 % Lösung) im nüchternen Zustande in den Magen, das Controllthier bekam 40 cbcm. 0,7 % ClNa-Lösung. Nach 24 Stunden wurden die Mägen herausgenommen, der Inhalt sorgfältig entleert und der Stickstoff bestimmt. Es fand sich im Mageninhalte

des Albumosen-Thieres: 0,40768 N = 2,546 gr. Albumosen,
des Controll-Thieres: 0,37474 N = 2,342 gr. Albumosen.
Die Differenz beträgt 0,03294 = 0,204 Albumosen.

Diese Differenz ist der Ausdruck für die im Inhalte befindlichen Albumosen; es würden somit von den eingeführten 2 gr. Albumosen 1,796 zur Resorption gelangt sein.

Diese Erwägungen legten von Neuem die Frage nahe, ob die Albumosen als solche dem Organismus einverleibt —

[1]) Verhandlungen d. XII. Congresses f. Innere Medicin (Wiesbaden 1893).

ohne einer etwaigen Verdauung zu unterliegen — von Nährwerth seien. So weit mir bekannt ist, liegen in der Litteratur noch keine Untersuchungen bezüglich des Nährwerthes von N-haltigen Substanzen bei subcutaner Einverleibung mit genauer Ermittelung der N-Bilanz vor. Ich habe zwar schon über einige Parallelversuche an zwei kleinen Hunden gleicher Race berichtet[1]), in denen subcutane Einverleibung von Albumosenlösung sich als wirksam im Sinne einer Aufbesserung des Ernährungszustandes erwies. Doch konnten sichere Resultate nur an grossen Thieren angestellte Versuche liefern. Als Versuchsthier diente der schon früher zu Stoffwechselversuchen benutzte Hund von 24 Kg.

In einem ersten Versuche erhielt das Versuchsthier, nachdem es auf N-Gleichgewicht gelangt war, 3 Tage lang eine vollständig ausreichende Nahrung, nämlich 200 gr. Fleisch, 200 gr. Reis, 55 gr. Butter, 10 gr. Kochsalz; in der darauf folgenden Periode wurden 50 gr. des Fleisches ersetzt durch eine chemisch äquivalente Menge Albumosen, welche dem Versuchsthier subcutan einverleibt wurden. Um in beiden Fällen gleiche Bedingungen herzustellen, erhielt das Versuchsthier in der ersten Periode die gleiche Menge indifferente Kochsalzlösung subcutan. Die Durchführung des Versuches wurde indess dadurch vereitelt, dass das Thier vom zweiten Tage der Albumosenperiode ab nicht mehr die ganze ihm vorgesetzte Nahrung frass. Es musste daher die Versuchsanordnung in der Weise abgeändert werden, dass dem Versuchsthier eine an sich unzureichende Nahrung zugeführt wurde. In einer vorbereitenden zehntägigen Periode wurden pro Tag 100 gr. Fleisch, 5 gr. Albumosen, 100 gr. Reis, 28,5 gr. Butter, 5 gr. Kochsalz verfüttert; das Thier ging in seinem Körpergewicht bis 22,710 Kg. herab. Nunmehr wurde in drei je zweitägigen Serien folgende Nahrung verabreicht:

1. Serie: pro die 100 gr. Fleisch u. 5 gr. Albumosen innerlich (100 cbmc., 0,7 % Cl Na subcutan).
2. Serie: pro die 100 gr. Fleisch u. 5 gr. Albumosen subcutan (in 5% steriler Lösung).
3. Serie: pro die 100 gr. Fleisch u. 5 gr. Albumosen innerlich (100 cbcm. 0,7 % Cl Na subcutan).

---

[1]) L. c.

		Einnahmen.					Ausscheidungen.							
	Dat.	Eiweiss N.	Extr. N.	Ges. N.	Kohle-hydrate.	Fett.	Harn-Menge.	Koth-Menge.	Sp. Gew. Harn.	Harn N.	Koth N.	Ges. N.	Bilanz.	Körpergewicht. 22,710 Kl.
1. Serie	27. April.	4,969	0,26	5,229	80	24,8	770	—	1017'	5,16	0,91	6,07	- 0,841	— 0,936 p. die.
	28. »	4,969	0,26	5,229	80	24,8	650	174 gr.	1015'	5,35	0,91	6,26	— 1,031	22,860 Kl.
2. Serie	29. »	5,089	0,26	5,349	80	24,8	465	—	1023'	5,95	0,487	6.430	— 1,088	— 1,148 p. die.
	30. »	5,089	0,26	5,349	80	24,8	445	71 gr.	1023,5'	6,07	0,487	6,557	— 1,208	22,410 Kl.
3. Serie	1. Mai.	4,849	0,26	5,109	80	24,8	535	—	1022,5'	6,45	0,86	7,36	-- 2,201	— 1,091 p. die.
	2. »	4,849	0,26	5,109	80	24,8	760	105 gr.	1015,5'	4,13	0,86	4,99	+ 0,019	22,380 Kl.

Die Harnmenge erfuhr in der Albumosenperiode (Serie 2) eine Verminderung, das spec. Gewicht stieg und die Gesammtstickstoffausscheidung im Harn nahm zu; im Koth war die N-Ausscheidung während der Albumosenperiode (bei subcutaner Application der Albumosen) geringer.

Die täglichen N-Verluste in den verschiedenen Perioden waren nur um ein Geringes verschieden. Sie betrugen in:

1. Serie . . . . . 0,936 pro die,
2. Serie . . . . . 1.140 pro die,
3. Serie . . . . . 1,091 pro die.

Hingegen zeigte das Verhalten des Körpergewichtes auffallende Schwankungen in den verschiedenen Serien.

In der ersten Serie nahm das Körpergewicht um 175 gr. pro die ab[1]). In der zweiten Serie stieg das Körpergewicht um 25 gr. pro die. In der dritten Serie sank das Körpergewicht wiederum um 15 gr. pro die. In einer vierten Periode, in der pro Tag 25 gr. Fleisch statt 5 gr. Albumosen gereicht wurden, sank es um 85 gr. pro die.

Es hat demnach während der subcutanen Darreichung der Albumosen ein Stillstand der Körpergewichtsabnahme stattgefunden, der, wie es scheint, auch noch in der nächstfolgenden Periode sich bemerkbar macht. Ein später an demselben Versuchsthier bei gleicher Ernährung — aber mit ausschliesslich innerlicher Darreichung der Albumosen — angestellter Versuch ergab, dass unter sonst gleichen Verhältnissen die Gewichtsabnahme eine wesentlich grössere ist.

Schon hieraus geht hervor, dass der etwaige Einwand, die Körpergewichtszunahme in der Albumosenperiode II. sei ausschliesslich durch Wasserretention bedingt, nicht stichhaltig ist; denn wenn auch die in den folgenden Tagen entleerten Harnquanta die in den ersten Perioden erhaltenen übersteigen — ein Theil dürfte übrigens auf das Plus der in den 25 gr. Fleisch enthaltenen Flüssigkeit zu beziehen sein —, so ist doch das schliessliche Körpergewicht als ein relativ hohes zu bezeichnen.

---

[1]) Ungefähr ebenso gross war die in der 10tägigen vorausgehenden Periode eingetretene Gewichtsabnahme pro Tag.

Das Versuchsergebniss stimmt so auffallend mit den am Menschen gewonnenen hinsichtlich des Verhaltens des Körpergewichts überein, dass man in der That auch hier die höhere Werthigkeit des subcutan verabreichten Albumosen-N gegenüber dem innerlich dargereichten Albumosen- und Fleisch-N bezüglich des Nährwerthes zur Erklärung in Anspruch nehmen darf.

Ich habe bereits früher mitgetheilt, dass man die Albumosen bis zu einer gewissen Höhe in's subcutane Zellgewebe injiciren kann, ohne dass ein Theil davon im Harn nachweisbar wird; auch bei dem erwähnten Versuche am Hund liessen sich niemals Albumosen, Pepton oder sonstige Eiweisskörper im Harn nachweisen.

Man könnte nun die Frage aufwerfen, was geschieht mit den dem Organismus subcutan zugeführten Albumosen?

A. Kossel[1]) machte neuerdings auf die grosse Bedeutung der von A. Schmidt gefundenen Thatsache aufmerksam, dass das Cytoglobin und Präglobulin, also typische Bestandtheile thierischer Zellen, im Blutserum in Paraglobulin übergehen; Hammarsten sah Caseïn, welches er in Blutserum brachte, in einen globulinartigen Körper übergehen.

Ich bin deswegen der Frage näher getreten, inwieweit unsere Albumosen vielleicht eine ähnliche Umwandlung unter dem Einfluss des Blutserums erfahren können.

Es wurden 30 cbcm. frisches Hundeblutserum mit 5 cbcm. 10proc. Albumosenlösung (0,4 gr. Albumosen) zusammengebracht und in den Brutofen bei 36° gestellt; zur Controlle wurden 30 cbcm. Blutserum mit 5 cbcm. physiologischer Kochsalzlösung vermischt und diese sowie auch gesondert davon 5 cbcm. 10proc. Albumosenlösung gleichfalls in den Brutofen gebracht. Nach 18stündigem Stehen wurden in dem Blutserum-Albumosengemische, sowie in den beiden nach Herausnahme aus dem Thermostaten vereinigten Controllen die Gesammtmenge der Globuline, Serumalbumine und restirenden Albumosen gesondert bestimmt.

---

[1]) Berliner klinische Wochenschrift 1893, Nr. 21.

Es fanden sich:

	Serum-Albumosengemisch.	Controlle.	Differenz.
Globuline	1,4136	1,2550	0,1586
Serum-Albumine[1] .	0,825	0,851	0,026
Albumosen. . . .	0,2625	0,3531	0,0906

Die kleine Differenz in der Gesammtmenge der Serumalbumine beider Proben ist leicht durch Versuchsfehler erklärlich, wenn man berücksichtigt, dass in den Lösungen 3 Eiweisskörper neben einander zu bestimmen waren. Es darf somit die bei der Bestimmung der Globuline gefundene Differenz (0,1586) nicht als aus den Serumalbuminen entstanden angesehen werden; vielmehr sind die gefundenen 0,1586 Globuline als aus den ursprünglichen (0,4 gr.) Albumosen hervorgegangen zu betrachten. Es mussten in Folge dessen die Albumosen um dieselbe Menge (0,1586) abgenommen haben; eine directe Bestimmung der als Albumosen restirenden Eiweisskörper ergab nicht die obige Differenz, sondern nur 0,0906.

Es würden also nach dem Ergebniss der Globulinbestimmung circa 39,5 %, nach dem der Albumosenbestimmung circa 22,5 % der ursprünglichen Albumosen in Globuline unter dem Einflusse des Blutserums übergeführt worden sein. Wenn somit auch die gewonnenen Zahlen nur einen relativen Werth beanspruchen können, so ist immerhin die Wichtigkeit der erwähnten Thatsachen für das Verständniss des Schicksals der dem Organismus einverleibten Albumosen leicht ersichtlich.

Injicirt man Thieren Albumosen subcutan oder intravenös, so geht ein Theil als solcher, ein Theil als Pepton in den Harn über, jedoch handelt es sich dabei immer nur um geringe Mengen im Vergleich zur injicirten Quantität. Folgender Versuch sollte Aufschluss geben, was mit dem im Organismus zurückbehaltenen Theile geschieht.

---

[1]) Der gefundene Procentgehalt von Globuline und Serumalbuminen stimmt annähernd mit dem von anderen Autoren angegebenen überein.

Ein Hund von 4 Kg. Gewicht: 9 Uhr Vorm. Entnahme von 15 cbcm. Blut aus der Femoralarterie und Einfliessenlassen in 15 cbcm. concentrirte Magnesiumsulfatlösung. Alsdann langsame intravenöse Infusion einer klaren Albumosenlösung (2 gr. in 7 cbcm. H_2O). 10 Uhr 10 Min. (eine Stunde nach der Injection) wiederum Blutentnahme; das Blut wird in gleicher Weise aufgefangen wie in Probe I.

Die Untersuchung ergab ein Fehlen der Albumosen in beiden Proben.

Probe I enthielt 1,603 gr. Globuline,
Probe II enthielt 1,966 gr. Globuline.

Zur Controlle wurde einem Hunde einmal im nüchternen Zustande, alsdann 1 Stunde nach intravenöser Injection von 7 cbcm. 0,7 % ClNa-Lösung Blut entnommen und wie oben angegeben auf Globuline untersucht; es fand sich in der zweiten Blutprobe ebenfalls eine, wenn auch wesentlich geringere Zunahme, nämlich 0,145. Es erinnert diese Zunahme des Globulins im Blute nach einem Aderlass an die bereits bekannte Vermehrung der Globuline (bei gleichzeitiger Verminderung der Serumalbumine) im Hungerzustande.

Bei directem Zusatz von Albumosenlösung zu frisch der Ader von Hunden entnommenem Blute machte sich eine geringe Verzögerung des Gerinnungsvorganges geltend; dasselbe zeigte sich bei Zusatz von Deuteroalbumose, während Heteroalbumose, der zweite Hauptbestandtheil des Präparates, eine wesentlich grössere Verzögerung hervorrief. Ebenso stark verzögernd erwiesen sich im Procentgehalt entsprechende Lösungen der in dem Präparat enthaltenen Salze (durch Veraschen gewonnen).

Direct in's Gefässsystem von nüchternen Hunden injicirt erzeugten weder Albumosenlösungen noch die ihrer Bestandtheile eine Alteration der Gerinnungsfähigkeit des Blutes im Gegensatz zu dem Verhalten von Lösungen richtigen Peptons. Der Blutdruck erfuhr erst bei wesentlich höheren Dosen, als vom Pepton erforderlich sind, eine merkliche Senkung. Hunde, denen auf diese Weise bis 1 gr. Albumosen per Kilo Thier in Lösung intravasal eingeführt wurden, zeigten auch bei

längerer Beobachtung nichts Abnormes, ebenso Thiere, denen einer der erwähnten beiden Bestandtheile allein injicirt worden war.

Nach intravenöser Injection von Deuteroalbumose fanden sich im Harn geringe Mengen Albumosen und Spuren von Pepton; nach Injection von Heteroalbumosen erschienen ausschliesslich Albumosen im Harn, kein Pepton.

Bei Injection von Lösungen der Deutero- und Heteroalbumosen in die Bauchvene (herzwärts) von Fröschen trat an dem blossgelegten Herzen eine Verlängerung der Diastole und unvollständige Contraction der Ventrikel ein. Bei Anwendung concentrirterer Lösungen erfolgte (vorübergehender) diastolischer Herzstillstand. Ein frisch ausgeschnittenes Froschherz hört in diesen Lösungen in kurzem auf zu schlagen; bringt man es nun wieder in physiologische Kochsalzlösung, so beginnt bald wieder der Rhythmus der Contractionen. Diese Wirkungen sind bedingt durch die in den verwandten Producten enthaltenen Salze, da entsprechende Lösungen dieser Salze (erhalten durch Veraschen) die gleichen Phänomene erzeugen.

Ueber die Natur der Kohlehydrate des normalen Harns.

I. Mittheilung.

Von

Karl Baisch.

(Aus dem Laboratorium von Professor Baumann, Freiburg i. B.)
(Der Redaction zugegangen am 30. Juni 1893.)

Durch Untersuchungen von Brücke[1]), Bence-Jones[2]), Abeles[3]), Schilder[4]) und Anderen ist das Vorkommen von Traubenzucker oder dem Traubenzucker ähnlichen Substanzen im normalen Harn festgestellt oder mindestens sehr wahrscheinlich gemacht worden. Es ist aber bis dahin nicht gelungen, die zuckerartigen Substanzen des Harns im reinen Zustand zu isoliren. Einen Weg, um eine Verbindung dieser Körper in reinem Zustand darzustellen, schien eine Beobachtung von E. Baumann[5]) zu eröffnen, welcher fand, dass im normalen Harn mehrere Substanzen enthalten sind, welche beim Schütteln des Harns mit Benzoylchlorid und Natronlauge in Wasser und in Alkalien unlösliche Benzoylverbindungen bilden und dass nach vorläufigen Versuchen dabei immer etwas von einem benzoylirten Traubenzucker ausgefällt werde.

[1]) Wiener medic. Wochenschrift, Bd. 19, S. 20, 1858; Sitzungsber. der math.-naturw. Cl. der kgl. Akad. d. Wissensch. z. Wien, Bd. 39, S. 15.

[2]) Chem. Soc. Quart. Journ., Bd. 14, S. 22; Chem. Centralblatt, 1862, S. 633.

[3]) Centralbl. f. d. med. Wissensch., 1879, 33, 209, 385.

[4]) Wiener med. Blätter 1886, S. 384.

[5]) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 19, S. 3220.

Später zeigte v. Udránszky[1]), dass diese Benzoylverbindungen die Schiff'sche Furfurolreaction in eclatanter Weise geben und schloss daraus, was durch die Furfurolreactionen, welche jeder normale Harn gibt, bestätigt wurde, dass Zuckerarten constante Bestandtheile jedes Harns seien.

Die aus dem Harn abgeschiedenen Benzoylverbindungen wurden zuerst von Wedenski[2]) untersucht, welcher feststellte, dass sie geringe Mengen von stickstoffhaltigen Substanzen enthalten und bei der Analyse des Kohlenstoff- und Wasserstoffgehaltes Werthe lieferten, welche zwischen denen liegen, die den Benzoylestern des Traubenzuckers und denen des Dextrins und Glycogens entsprechen.

Es war indessen damals schon bekannt, dass bei der Benzoylirung der Zuckerarten immer Gemenge verschiedener Benzoylverbindungen erhalten werden und Wedenski bemerkt deshalb mit Recht, dass aus den von ihm mitgetheilten Analysen bestimmte Schlüsse auf die eine oder andere Benzoylverbindung eines bestimmten Kohlehydrates nicht gezogen werden können.

Bei dem Versuch, den Ester zu spalten, fand Wedenski sodann, dass er sich durch Erhitzen mit Natronlauge nur zum Theil verseifen lässt. Die dabei erhaltene vom nichtverseiften Theile abfiltrirte Lösung gab mit Kupfersulfat einen blauen, flockigen Niederschlag, der gesammelt und in starker Salzsäure gelöst beim sofortigen Versetzen mit absolutem Alkohol eine weissliche Fällung erzielen lässt — ein Verhalten, wie es Landwehr[3]) als für das thierische Gummi charakteristisch angegeben hatte.

Den mit Natronlauge nicht verseifbaren Antheil behandelte er mit verdünnter Schwefelsäure und erhielt dadurch nach Entfernung der abgespaltenen Benzoësäure durch Aether eine Lösung, die sich gegen Alkalien und alkalische Kupfer oder Wismuthlösung wie Traubenzucker verhielt und wieder

---

[1]) Diese Zeitschr., Bd. 12, S. 379.

[2]) Diese Zeitschr., Bd. 13. S. 120.

[3]) Centralbl. f. d. med. Wissensch., Bd. 23, S. 369.

benzoylirt werden konnte — deren wirksame Substanz er deshalb auch für Traubenzucker ansprach.

Wedenski's Untersuchungen waren, wie am Schlusse seiner Veröffentlichung mitgetheilt wird, nur vorläufige, nicht zum Abschluss gebrachte, sie wurden von Luther, Roos, Treupel und Anderen zum Theil auf anderen Wegen weiter verfolgt.

Luther, der in seiner Inaugural-Dissertation «Ueber das Vorkommen von Kohlehydraten im normalen Harn» sich ausführlich mit den verschiedenen Methoden des qualitativen und quantitativen Nachweises von Zucker im normalen Harn beschäftigt, combinirte zuerst die Furfurolreaction mit der Gährungsmethode und seine Resultate sind für unsere Zwecke deshalb von Interesse, weil er auf diesem Wege zu einer bestimmten Verhältnisszahl von Traubenzucker und thierischem Gummi gelangen zu können glaubte. Er bestimmte nämlich mittels der Furfurolreaction im frischen Harn den Kohlehydratgehalt, liess alsdann den Harn mit Hefe vergähren und bestimmte wieder. Die Differenz der zwei Werthe bezog er auf Traubenzucker, den Rest auf nicht vergohrenes thierisches Gummi [1]). Er kam so zu der Anschauung, dass das thierische Gummi den grösseren Theil, nämlich 52 % der im Harn enthaltenen Kohlehydrate darstelle. Auf diese Schlussfolgerungen Luther's soll später genauer eingegangen werden.

Salkowski hat bei einer Untersuchung über die Bildung flüchtiger Fettsäuren bei ammoniakalischer Harngährung gefunden, dass Harn, der lange Zeit gefault hat, die Molisch-Udránszky'sche [2]) Furfurolreaction unvergleichlich schwächer zeigt, als der frische Harn, während er die Schiff'sche Reaction noch in ausgeprägter Weise gibt.

Treupel [3]) hat an der Hand der Furfurolreaction die Veränderung des Kohlehydratgehalts während der Fäulniss des Harns genauer verfolgt.

---

1) S. 43 ff.

2) Diese Zeitschr., Bd. 13, S. 270.

3) Diese Zeitschr., Bd. 16, S. 47.

Neuerdings hat Salkowski[1]), dessen Erörterungen über den Benzoësäureester der Kohlehydrate des Harns im Wesentlichen kritischer Natur sind, gefunden, dass aus 100 cbcm. Harn nach der Benzoylirung, wie sie Wedenski angegeben hat, bei einer grösseren Zahl von Versuchen 0,122—0,366 gr. Ester erhalten werden, im Mittel 2,024 gr. aus 1 L. Dabei werden die Schwierigkeiten betont, welche die Filtration der Benzoylverbindungen bereitet und Angaben über Löslichkeitsverhältnisse dieser Ester gemacht. Salkowski bestimmte ferner den Stickstoffgehalt, welcher im Mittel seiner Versuche 1,4 % betrug, und fand, dass auch Spuren von Schwefel vorhanden sind. Er ist darnach geneigt, eine Beimengung von Eiweisssubstanzen, bezw. von Nucleoalbuminen anzunehmen. Wäre diese Ansicht richtig, so würde jeder Liter normalen Harns ca. 0,175 gr. an Eiweisssubstanzen bezw. Nucleoalbuminen enthalten. Im Uebrigen bestreitet Salkowski, dass der Beweis für das Vorhandensein von Gummi und Traubenzucker in den verseiften Lösungen von Wedenski erbracht sei.

Um nun die verschiedenen meist schon von Wedenski angegriffenen, aber nicht zum Abschluss gebrachten Fragen ihrer Lösung näher zu führen, habe ich einer Aufforderung von Herrn Professor E. Baumann entsprochen und diese Untersuchungen wieder aufgenommen. Sie erstrecken sich auf die Gewinnung und die Eigenschaften der Kohlehydratester, auf das Vorhandensein des thierischen Gummis im normalen Harn und in einem dritten Theil auf die Verseifung des Esters und die Natur der dadurch erhaltenen Zuckerlösungen.

Die ursprüngliche Wedenski'sche[2]) Vorschrift zur Darstellung des Esters bestimmt für 100 cbcm. des von den mit Natronlauge gefällten Phosphaten abfiltrirten Harns 3—5 cbcm. Bezoylchlorid und 25—40 cbcm., also das achtfache Lauge. Für den Harn von Hunden und Kaninchen fand Roos[3]) eine

---

[1]) Diese Zeitschr., Bd. 17, S. 229.
[2]) Diese Zeitschr., Bd. 13, S. 120.
[3]) Diese Zeitschr., Bd. 15, S. 513.

grössere Menge Natronlauge nöthig, um die sonst auftretende reichliche Bildung von Benzamid aus dem im Harn dieser Thiere vorhandenen Ammoniak zu vermeiden. Er nahm die zehnfache Menge Natronlauge und verdünnte concentrirt Harne vor dem Benzoyliren. Dass man dadurch in der That die Ausscheidung von Benzamid vermindern oder verhindern kann, hat Lehmann[1]) gezeigt. Er stellte fest, dass beim Schütteln von Benzoylchlorid mit viel Natronlauge bei Gegenwart von Ammoniak sehr viel weniger Benzamid gebildet wird, als wenn Benzoylchlorid mit wässerigem Ammoniak allein behandelt wird, dass jedoch im menschlichen Harn, wenn nicht grössere Mengen Ammoniak vorhanden sind, die Bildung von Benzamid unterbleibt, da es im Gegensatz zu den Estern mehrwerthiger Alkohole leicht verseifbar ist, dass daher je mehr Natronlauge verwendet wird, desto weniger Benzamid auftritt.

Aus den bisher vorliegenden Untersuchungen geht nicht hervor, ob die von Wedenski und Anderen verwendeten Mengen von Benzoylchlorid das Maximum an Ausbeute der Benzoylverbindungen aus dem Harn liefern, ferner liegen abschliessende Erfahrungen darüber noch nicht vor, wie das Verhältniss des Benzoylchlorids und der Natronlauge am besten zu wählen ist. Hierüber sowie über den Weg, auf welchem man die Benzoylverbindungen des Harns möglichst frei von Beimengungen erhält, habe ich zunächst Versuche angestellt.

Verhältniss von Benzoylchlorid und Natronlauge.

Um darüber zu einer bestimmten Formulirung zu gelangen, wurde 1 Liter Harn in zwei gleiche Theile getheilt; zur Benzoylirung des ersten wurden genommen (auf 1000 cbcm. Harn berechnet) 40 cbcm. Benzoylchlorid und 400 cbcm. Natronlauge. Der Niederschlag war feinkrümelig, löste sich leicht vom Glas und betrug pro 1000 cbcm. 2,078 gr.

Die zweite Hälfte wurde behandelt mit 40 cbcm. Benzoylchlorid und 320 cbcm. Natronlauge. Auch hier reagirte das Gemisch nach vollendeter Reaction alkalisch, der Niederschlag war jedoch schmierig, nur sehr schwer auf das Filter zu

[1]) Diese Zeitschr., Bd. 17, S. 405.

bringen und wog über Schwefelsäure getrocknet, nachdem constantes Gewicht eingetreten war, 2,216, d. h. auf 1000 cbcm. berechnet 4,432 gr., also mehr als das Doppelte des nicht verschmierten Esters.

Auch durch nachträglichen Zusatz von Alkali ist der Schaden nicht wieder gut zu machen.

Der Ester ist zwar hin und wieder auch bei nur achtfachem Ueberschuss von Lauge krümlig, meist aber wie gesagt klebrig und erhärtet nicht. Die Filtration ist, wie auch Salkowski klagt, mit grossen Schwierigkeiten verknüpft und immer sehr zeitraubend.

Eine weitere Folge ist, dass ein solcher Niederschlag überhaupt nicht ausgewaschen werden kann und deshalb grossen Aschegehalt zeigt. Dies tritt namentlich hervor, wenn man den durch Eindampfen concentrirten Harn in der oben genannten Weise benzoylirt. Dabei wurden Präparate erhalten, welche nach dem Auswaschen einen Aschegehalt von 13 % zeigten. Die Asche bestand aus phosphorsaurer Magnesia und phosphorsaurem Kalk.

Mengenverhältniss des Benzoylchlorids.

Von fundamentaler Bedeutung ist ferner die absolute Menge von Benzoylchlorid, die auf den Liter Harn genommen wird. Wie von dem Verhältniss zur Natronlauge die Beschaffenheit des Esters abhängt, so von dem Verhältniss des Benzoylchlorids zum Harn seine Menge.

Nimmt man 40 cbcm. Benzoylchlorid und die zehnfache Menge Lauge, so erhält man einen weisslichen, fast farblosen feinkrümeligen Niederschlag und eine zweite Benzoylirung der abfiltrirten Flüssigkeit ergibt eine so geringe Fällung, dass man sie bei dem sehr geringen specifischen Gewicht des getrockneten Esters für gewöhnlich ignoriren darf.

Nimmt man weniger Benzoylchlorid bei zehnfachem Ueberschuss von Lauge, so erhält man weniger Ester. Dies zeigen folgende Versuche:

500 cbcm. frischen Harns wurden mit 20 cbcm. Benzoylchlorid und 200 cbcm. Natronlauge versetzt, es wurden erhalten 0,625 gr. Ester.

500 cbcm. desselben Harns lieferten mit 10 cbcm. Benzoylchlorid und der zehnfachen Menge Lauge nur 0,377 gr.

Ferner gaben 500 cbcm. eines andern Harns mit 20 cbcm. Benzoylchlorid und 200 cbcm. Lauge 1,000 gr., während 1000 cbcm. des nämlichen Harns mit 30 cbcm. Benzoylchlorid und 300 cbcm. Natronlauge 1,371 gr. lieferten.

Im ersten Fall betrug die Ausbeute bei Verwendung von nur der Hälfte Benzoylchlorid 60,3 %, im zweiten Fall 68,5 % des mit 40 cbcm. Benzoylchlorid auf 1000 cbcm. Harn gewonnenen Esters.

	Menge des Benzoylchlorids auf 1000 cbcm. Harn.	Menge des Esters auf 1000 cbcm. Harn.
I.	40 cbcm.	1,250
	20 »	0,754
II.	40 cbcm.	2,000
	30 »	1,371

Eigenschaften der Benzoylverbindungen aus dem Harn nach vorausgegangener Fällung mit Natronlauge.

Der ausgewaschene und getrocknete Ester ist nun kein reines Präparat. Er enthält vielmehr, selbst wenn man die Vorsicht gebraucht, den mit Natronlauge versetzten Harn vor dem Abfiltriren der Phosphate über Nacht stehen zu lassen, immer noch bis zu 1,6 %, im Mittel 1 % Asche. Dieselbe besteht im Wesentlichen aus phosphorsaurer Magnesia.

Der Stickstoffgehalt eines Präparates, welches 0,4 % Asche enthielt, betrug 2,0 %.

Der Schmelzpunkt liegt, je nach dem grösseren oder geringeren Aschegehalt bei 65—95°, während bei ungefähr 55° ein starkes Zusammensintern zu beobachten ist[1]).

[1]) Bei den nie völlig zu entfernenden Beimengungen des amorphen Esters kann die Schmelzpunktbestimmung selbstverständlich nur einen relativen Werth beanspruchen. Gewöhnlich sintert der Ester bei ziemlich niederer Temperatur, meist 55°, bräunt sich dann, erweicht und wird unter Gasentwicklung und Zersetzung flüssig. Diesen Punkt habe ich jeweils als Schmelzpunktstemperatur notirt, während eine völlige Klärung der flüssigen Masse häufig erst bei viel höherer Temperatur eintritt.

Um die Asche völlig zu entfernen, wurde der Esterniederschlag mit wenig verdünnter — ca. 2procentiger — Salzsäure zerrieben, auf ein kleines Filter gebracht und bis zum Verschwinden des Chlors im Filtrat mit Wasser sorgfältig ausgewaschen.

Der so gereinigte Ester ist fast völlig farblos.

Die Asche wird durch diese Behandlung in der That vollständig entfernt, der Stickstoff dagegen nicht, er betrug noch 2,3 %.

Die Analyse des Kohlenstoff- und Wasserstoffgehaltes ergab folgende Werthe:

C : 67,72, H : 5,57.

Der gereinigte Ester sintert bei 55°, bräunt sich und erweicht bei 100°, er schmilzt unter Gasentwicklung bei 125°.

Darstellung der Benzoylverbindungen aus dem Harn nach vorausgegangener Fällung mit neutralem Bleiacetat.

Um die Schwierigkeit und Unannehmlichkeit bei der Filtration zu vermeiden, zugleich in der Erwartung, ein aschevielleicht auch stickstoffärmeres Präparat zu erhalten, wurde nun ein anderer Weg eingeschlagen. Der frische, sauer reagirende Harn wurde mit einer concentrirten Lösung von neutralem Bleiacetat versetzt, so lange noch ein Niederschlag entstand, wozu etwa 150 cbcm. auf den Liter Harn erforderlich sind. Das überschüssige Blei wurde mit Schwefelwasserstoff, dieser noch vor dem Abfiltriren des Schwefelbleis durch Einleiten von Kohlensäure — rascher noch von atmosphärischer Luft — entfernt und sodann mit den oben angegebenen Mengen von Benzoylchlorid (40 cbcm. auf 1 L. Harn) und Natronlauge benzoylirt. Nun lässt man einige Stunden stehen, bis sich der Niederschlag zu Boden gesetzt hat. In weniger als einer halben Stunde ist die Flüssigkeit bei Verwendung von 1 L. Harn durch ein kleines Faltenfilter filtrirt und geht vom ersten Tropfen an klar durch dasselbe. Ebenso leicht und rasch erfolgt das Auswaschen des Niederschlags, dieser selbst ist pulverig und nur leicht gelb gefärbt.

Eine naheliegende Frage ist jedoch die, ob nicht durch die Fällung mit Bleiacetat grössere oder geringere Mengen von Zucker verloren gehen. Es wurden zur Beantwortung derselben zwei Parallelversuche angestellt, indem jedesmal 1 Liter frischen Harns in zwei gleiche Theile getheilt, in dem ersten mit Natronlauge die Phosphate gefällt, der andere mit Bleiacetat u. s. w. behandelt wurde. Benzoylirt wurden beide Theile mit denselben Mengen Benzoylchlorid und Natronlauge.

Es wurde an Ester erhalten:

	Ohne Bleiacetat-Fällung.	Nach der Fällung mit Bleiacetat.
I.	1,202 gr.	0,742 gr.
II.	3,370 gr.	2,360 gr.

Im Mittel betrug also der nach der Bleimethode gewonnene Niederschlag nur 65 % des ohne Blei erzielten Esters. Dieses Verhältniss ist indessen kein constantes, wie weitere Versuche zeigten (s. u.).

Auch er ist nicht aschefrei. Der geringste Aschegehalt war 0,3 %, das Mittel verschiedener Bestimmungen beträgt 0,47 %. Eine der Behandlung mit Bleiacetat vorhergehende Fällung mit Natronlauge ändert daran nichts Wesentliches.

Es wurden von zwei Präparaten Stickstoffbestimmungen gemacht. Das eine hatte 2 % (bei 0,3 % Asche), das andere (bei 1,47 % Asche) 1,5 % Stickstoff.

Die Kohlenstoff- und Wasserstoffanalyse des 0,3 % Asche enthaltenden Esters lieferte:

C : 66,49 % und H : 5,15 %.

Eine Untersuchung auf Schwefel, die in der Weise angestellt wurde, dass ein Gemisch des Esters mit Soda in einem Gemenge von Soda und chlorsaurem Kali geschmolzen und die filtrirte wässrige Lösung des Rückstands mit Salzsäure und Chlorbaryum versetzt wurde, ergab erst nach längerem Stehen eine leichte Trübung. Dasselbe Resultat wurde bei Untersuchung von genau 1 gr. einer andern Portion Ester (mit 0,82 % Asche und 2,19 % Stickstoff) erhalten. Auch

hier zeigte sich erst nach längerem Stehen ein ganz geringer Niederschlag von Baryumsulfat.

Der so gewonnene Ester sintert bei 65° und schmilzt unter Gasentwicklung bei 100°.

Behandelt man ihn in der oben angegebenen Weise mit verdünnter Salzsäure, so sind die Ergebnisse folgende:

Der Stickstoffgehalt bleibt sich gleich. Ein Präparat, das vor der Behandlung mit Salzsäure 1,5 % Stickstoff enthielt, zeigte nach derselben genau ebensoviel. Bei einer andern Portion betrug der Stickstoff 2,19 %.

Der Aschegehalt dagegen sinkt auf Null.

Eine Analyse des Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalts ergab etwas höhere Werthe als frühere, nämlich:

C: 67,78 % und H 5,27 %.

Auch der Schmelzpunkt steigt. Der Ester erweicht bei 95° und schmilzt unter Gasentwicklung bei 135° zu einer rothbraunen Flüssigkeit.

Darstellung der Benzoylverbindungen aus dem Harn nach vorausgegangener Fällung mit basischem Bleiacetat.

Es lag nahe, zu untersuchen, wie sich bei Fällung des Harns mit basischem Bleiacetat die Eigenschaften der Ester, speciell der Asche und Stickstoffgehalt, ändern würden.

Zunächst galt es festzustellen, ob dadurch wesentlich weniger Ester erzielt würde als bei der Behandlung mit neutralem Bleiacetat. Zwei Versuche mit je gleichen Mengen Harns derselben Provenienz ergaben:

	Bei Fällung mit neutralem Bleiacetat.	Mit basischem Bleiacetat.	Verhältniss in %.
I.	0,958 gr. (500 cbcm. Harn)	0,854	89,1 %
II.	1,556 gr. (600 cbcm. Harn)	1,475	94,7 %

Zertheilt man den mit dem Bleiessig erzielten Niederschlag in Wasser und leitet Schwefelwasserstoff ein, so lässt sich in der vom Schwefelblei abfiltrirten Lösung durch Benzoyliren wieder eine geringe Menge Esters erhalten.

Die nach Fällung des Harns mit basischem Bleiacetat dargestellten Präparate sind weniger gefärbt, als die, welche nach Behandlung des Harns mit neutralem Bleiacetat erhalten wurden, aber mehr krümlich als pulverig, beide sind gleich rasch und reinlich abzufiltriren und auszuwaschen, dagegen ist der Aschegehalt wider Erwarten ein grösserer, er betrug nämlich bei I 7,39 %, bei II sogar 18,8 %. Die Asche bestand im Wesentlichen aus Phosphaten, enthielt aber kein Blei.

Der so stark verunreinigte Körper schmilzt nicht mehr beim Erhitzen, sondern verkohlt.

Ein Präparat mit 17 % Asche wurde mit Salzsäure behandelt und enthielt alsdann noch 0,19 % Asche. Eine nun vorgenommene Stickstoffbestimmung ergab 1,42 % Stickstoff.

Dieser Ester sintert bei 55°, erweicht bei 90° unter Bräunung und schmilzt mit Gasentwicklung bei 120°.

Woher der hohe Stickstoffgehalt rührt, kann zur Zeit mit völliger Entschiedenheit nicht gesagt werden. Dass er nicht, wie Salkowski meint, von Eiweissestern herstammt, kann leicht bewiesen werden. Auf Grund der von ihm ausgeführten Stickstoffbestimmungen und eines geringen Schwefelgehaltes der Benzoylverbindungen kam Salkowski zu der Ansicht, dass den letzteren etwa 14 Procent Albuminester beigemengt seien.

Diese Annahme ist indessen nicht zutreffend. Wenn man aus der Ausbeute an Benzoylverbindungen des Harns (nach Salkowski 2,042 gr. pro Liter) und einem mittleren Stickstoffgehalt derselben von 1,4 % berechnet, wie gross der Gehalt des Harns an Eiweisskörpern sein müsste, wenn letztere bei der Benzoylirung völlig in den Niederschlag übergingen, so ergäbe sich für den normalen Harn ein Gehalt von 0,175 gr. Eiweiss im Liter oder von 0,0175 %. Man überzeugt sich aber leicht, dass die verschiedenen Eiweisskörper bei der Benzoylirung nicht vollständig gefällt werden. Der Eiweissgehalt des normalen Harns müsste darnach noch mehr als 0,0175 % betragen, was nicht der Fall ist.

Auch der Umstand, dass der Stickstoffgehalt der Benzoylverbindungen nicht wesentlich vermindert wird, wenn man den Harn vor der Benzoylirung mit neutralem und mit basi-

schem Bleiacetat behandelt hat, schliesst die Annahme aus, dass es sich um Eiweisskörper handeln könne.

Um auch direct diesen Nachweis zu führen, habe ich nach den Angaben Schrötter's[1]) aus Eieralbumin eine kleine Menge der Benzoylverbindung des Albumins dargestellt. Von der getrockneten Substanz wurden 0,1 gr. mit 10 gr. der Benzoylverbindung aus reinem Traubenzucker innig gemengt. Diese Mischung, welche also nur 1 % der Albuminverbindung enthielt, gab beim Erhitzen mit Millon's Reagens noch eine sehr deutliche Rothfärbung. Die Benzoylverbindungen des Harns geben aber mit Millon's Reagens nicht die geringste Spur einer Eiweissreaction, sie enthalten somit Eiweisskörper überhaupt nicht.

Am Nächsten läge es, den Stickstoffgehalt auf Beimengung von Benzamid zu beziehen, dass auch diese Annahme nicht zulässig ist, darauf kann erst später eingegangen werden.

Was nun die Mengen der durch die einzelnen Methoden erzielten Esterniederschläge anbelangt, so wurde auf 1000 cbcm. Harn erhalten:

I. Bei Fällung mit Natronlauge allein.	II. Mit neutralem Bleiacetat.	III. Mit basischem Bleiacetat.
3,370 gr.	2,360 gr.	1,708 gr.
3,214 »	2,108 »	2,458 »
1,870 »	2,235 »	—
1,651 »	2,078 »	—
1,250 »	1,651 »	—
2,000 »	0,742 »	—
—	3,214 »	—
—	3,112 »	—

Das ergiebt im Mittel für I. 2,226 gr.
für II. 2,187 »
für III. 2,083 »

Das Gesammtmittel beträgt 2,165 gr. Das Minimum und Maximum liegt bei 0,742 und 3,370. Wedenski gab dafür die Zahlen 1,38—13,09. Er hatte seine Untersuchungen an

[1]) Ber. d. D. chem. Ges. 22, S. 1950.

älteren Patienten aus der hiesigen medicinischen Klinik gemacht, während meine Zahlen für Praktikanten des chemischen Laboratoriums gelten und vielleicht deshalb mehr mit denen Salkowski's übereinstimmen, der 1,22—3,66, im Mittel 2,042 gr. Ester im Liter Harn findet.

Eine tabellarische Uebersicht der wichtigsten Resultate möge hier noch folgen.

Behandlung des Harns vor dem Benzoyliren.	Durchschnittliche Menge des Esters	C-Gehalt.	H-Gehalt.	Durchschnittlicher N-Gehalt.	Durchschnittlicher Asche-Gehalt.	Schmelzpunkt.	Allgemeine Eigenschaften.
Mit Natronlauge. Der Niederschlag ist:							
a) mit Wasser	2,226	—	—	2 %	1 %	95°	Filtrirt anfangs trüb u. langsam. Niederschlag ist krümelig, gelb gefärbt.
b) mit Salzsäure ausgewaschen	—	67,72 %	5,57 %	2 %	0	125°	Weiss.
Mit neutralem Bleiacetat. Der Niederschlag ist:							
a) mit Wasser	2,187	66,49 %	5,15 %	1,7 %	0,5 %	100°	Filtrirt klar u. rasch. Niederschlag ist schwach gelblich, krümelig.
b) mit Salzsäure ausgewaschen	—	67,78 %	5,27 %	1,7 %	0	135°	Weiss.
Mit basischem Bleiacetat. Der Niederschlag ist:							
a) mit Wasser	2,083	—	—	—	11 %	verkohlt	Filtrirt klar u. rasch. Niederschlag ist schwach gelb, krümelig.
b) mit Salzsäure ausgewaschen	—	—	—	1,4 %	0,2 %	120°	Weiss.

Eine weitere Mittheilung wird die Frage nach dem thierischen Gummi behandeln und eine letzte die Resultate mittheilen, die bei der Verseifung des Esters gewonnen wurden. Diese Verseifung wurde mit Natriumäthylat vorgenommen, eine Methode, die Kueny[1]) bereits zur Spaltung der aus reinen Kohlehydratlösungen gewonnenen Benzoylestern verwendete. Hier sei zunächst nur soviel erwähnt, dass man bei dieser Behandlung der aus dem Harn zu gewinnenden Ester eine Lösung erhält, deren Gehalt an drehenden Substanzen mit dem Polarisationsapparat, an reducirenden mittelst Fehling-scher Lösung quantitativ bestimmt werden kann, die ferner mit Phenylhydrazin ein Glukosazon liefert, mit Hefe unter Alkoholbildung gährt, und die Furfurolreaction von Molisch und v. Udránszky mit grösster Schärfe noch nach starker Verdünnung der Lösungen gibt.

---

[1]) Diese Zeitschr., Bd. 14, S. 341.

Weitere Untersuchungen über die Xanthinkörper des Harns.

Von

Dr. Georg Salomon,
Privatdocenten an der Universität.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 7. Juli 1893.)

In einer kürzlich erschienenen Inaugural-Dissertation: «Zur Kenntniss der Xanthinkörper»[1]) beschreibt P. Balke unter dem Namen «Episarkin» einen neuen Xanthinkörper aus dem menschlichen Harn. Die nachfolgenden, zum Theil weit zurückdatirenden Beobachtungen bringen für diesen interessanten Befund eine fast uneingeschränkte Bestätigung.

I. Im Jahre 1884 fand ich[2]) unter den Xanthinkörpern des Schweineharns und zwar in der Hypoxanthinfraction[3]) eine in makroskopischen Prismen krystallisirende Substanz, die durch Ammoniak aus ihren Lösungen gefällt wurde, mit Pikrinsäure ein intensiv gelbes Salz gab und keine schwerlösliche Natronverbindung bildete. Quecksilbersalze, sowie Bleiessig und Ammoniak erzeugten Niederschläge; die ammoniakalische Lösung wurde durch Silbernitrat gefällt. Die

[1]) Leipzig, bei Johann Ambrosius Barth (Arthur Meiner) 1893.

[2]) Ueber die chemische Zusammensetzung des Schweineharns. Virch. Arch., Bd. 95, S. 527—534, 1884.

[3]) Ich möchte vorschlagen, die beiden Gruppen, in welche die Xanthinkörper durch das Auflösen ihrer Silberverbindungen in heisser Salpetersäure (Neubauer'sches Verfahren) geschieden werden, der Kürze wegen als «Hypoxanthinfraction» und «Xanthinfraction» zu bezeichnen. Zur Hypoxanthinfraction würden gehören: Hypoxanthin, Guanin, Carnin, Adenin, Episarkin, zur Xanthinfraction: Xanthin, Paraxanthin, Heteroxanthin.

Xanthinprobe fiel positiv[1]), die Weidel'sche Probe negativ aus. Die Gesammtausbeute betrug 0,02 gr. in $5^1/_2$ L.

II. 4 Jahre später (1888) erhielt ich aus der Hypoxanthinfraction des Rinderharns einen ganz ähnlichen Körper[2]). Ueber sein Verhalten wurde damals Folgendes notirt: Makroskopische luftbeständige glänzende Nadeln und Prismen, die sich beim Erhitzen nicht trüben, auf dem Platinblech, ohne vorher zu schmelzen, verbrennen und weder bei der Xanthinprobe noch bei der Weidel'schen Reaction die bekannten Farbenveränderungen geben. In Wasser lösen sie sich schwer, leichter in heissem, leicht in Salzsäure, schwer in Salpetersäure, schwer in Ammoniak, durch welches sie aus ihren Lösungen gefällt werden. Die Lösung des salzsauren Salzes giebt mit Pikrinsäure gelbe, rosettenförmig angeordnete Krystalle, mit Goldchlorid compacte gelbgefärbte Krystalle und Nadelbüschel. Die ammoniakalische Lösung liefert bei Zusatz von Silbernitrat einen flockigen, in Ammoniak etwas löslichen Niederschlag, der, in heisser Salpetersäure gelöst, in die Hypoxanthinfraction übergeht. Durch Entsilbern, Abfiltriren, Uebersättigen mit Ammoniak wird der Körper in Form lanzettähnlicher Nadeln wiedererhalten. Die Ausbeute betrug 0,05 gr. aus 60 L. Harn; das trockene Präparat bildete eine seidenglänzende Masse.

III. Durch die Güte der Herren Geheimrath Gerhardt und Oberarzt Dr. v. Noorden erhielt ich im Laufe des letzten Jahres zweimal grössere Quantitäten von leukämischem Harn, die ich auf einzelne Xanthinkörper verarbeitete.

a) Mai 1892. Lienale Leukämie. 11 L. Harn. — Gewöhnliches Verfahren. Aus der Hypoxanthinfraction fallen beim Zusatz von Ammoniak zur wässerigen Lösung sofort Krystallnadeln aus. Gewicht 0,02 gr.; Eigenschaften dieselben wie unter b.

b) Januar 1893. Lienal-lymphatische Leukämie. 35 L. Harn. — Der von Phosphaten befreite Harn wurde

[1]) Vergl. jedoch unten S. 210, Z. 4 v. o.

[2]) Diese und die nachfolgenden Untersuchungen sind noch nicht veröffentlicht.

mit Silbernitrat gefällt, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das zur Trockne gedampfte Filtrat auf dem Wasserbade mit dreiprocentiger Schwefelsäure digerirt, stehen gelassen, filtrirt; das Filtrat sehr schwach ammoniakalisch gemacht, nach einigen Minuten von dem entstandenen Niederschlage abfiltrirt. Nach 24stündigem Stehen fanden sich an der Oberfläche der Flüssigkeit und am Boden des Gefässes spärliche gelbgefärbte Krystalle (Gewicht 0,120 gr.). Die abfiltrirte Flüssigkeit schied nach dem Verjagen des Ammoniaks noch 0,08 gr. roher Xanthinkörper ab, deren Hypoxanthinfraction fernere 0,016 gr. derselben Krystalle lieferte[1]). Die gesammte Ausbeute wurde in verdünnter Salzsäure gelöst, filtrirt, das Filtrat mit Ammoniak übersättigt. Sofort fiel ein dichter weisser Niederschlag aus, der durch starke Verdünnung und Kochen wieder in Lösung gebracht wurde. Nunmehr schied sich die Substanz langsam in grossen farblosen Prismen aus. Auf dem Filter gesammelt erschien sie als filzartige seidenglänzende Masse.

Die Krystalle sind luftbeständig, verbrennen auf dem Platinblech ohne zu schmelzen, geben weder die Xanthin- noch die Weidel'sche Reaction. Sie lösen sich sehr schwer in kaltem, leichter in heissem Wasser, nur schwer in Ammoniak, durch das sie aus ihren Lösungen gefällt werden, leicht in Salzsäure und Schwefelsäure, schwer in Salpeter säure. Die concentrirte Lösung des salzsauren Salzes giebt mit kaltgesättigter Pikrinsäurelösung einen aus grossen Büscheln bestehenden Niederschlag. Zusatz von Goldchlorid erzeugt in der salzsauren Lösung eine gut krystallisirte Fällung. Die ammoniakalische Lösung wird durch Silbernitrat gefällt; das Präcipitat verhält sich genau wie beim Rinderharn angegeben.

---

[1]) Ueber die weitere Bearbeitung vergl. unten S. 211.

Die Uebereinstimmung der vier Präparate untereinander bedarf nach der Aufzählung ihrer Reactionen kaum einer weiteren Erläuterung. Da die älteren Präparate noch vorhanden waren, so konnte ich leicht die einzige abweichende Angabe (über den Verlauf der Xanthinreaction bei dem Körper aus dem Schweineharn) nachprüfen und richtig stellen. Die Farbenreaction war jedenfalls durch Erhitzen über freiem Feuer (anstatt auf dem Wasserbade) entstanden.

Nur mit einem Reagens bin ich zu ungleichen Resultaten gekommen, nämlich mit dem Platinchlorid. Ein unzweifelhaftes Chloroplatinat, bestehend aus sandartigen polyedrischen Krystallen, habe ich allein beim Rinderharn bekommen; beim Schweineharn und beim leukämischen Urin erhielt ich Krystalle, die den Eindruck gelbgefärbter salzsaurer Salze machten. Vielleicht gelingt es mir, bei Gelegenheit den Widerspruch aufzuklären.

Höchst wahrscheinlich ist meine Substanz identisch mit Balke's Episarkin. Dafür sprechen nicht blos die bisher aufgezählten, mit der einzigen Ausnahme der Pikrinsäurereaction durchweg übereinstimmenden Eigenschaften, sondern auch einige von Balke besonders hervorgehobene Kennzeichen, die Violettfärbung beim Eindampfen mit chlorsaurem Kali und Salzsäure und nachträglicher Einwirkung von Ammoniak, sowie die Fällbarkeit durch Kohlensäure aus schwach ammoniakalischer Lösung. Wünschenswerth wäre es allerdings, über das Verhalten des Ammoniaks zum Episarkin etwas zu erfahren. Bisher liegt nur die Bemerkung von Balke vor, dass das Episarkin sich aus schwach ammoniakalischer Lösung innerhafb 12 Stunden ausgeschieden habe. Aber dieses Verhalten ist nicht beweisend für Schwerlöslichkeit in Ammoniak; Balke hat ganz dasselbe beim Heteroxanthin, einem in Ammoniak leicht löslichen Körper, beobachtet.

Die Ausbeute wurde bei meinen wie bei Balke's Darstellungen durch die Löslichkeit der Silberverbindung beeinträchtigt. Beim zweiten Leukämieharn, wo ich nach Entfernung der Harnsäure den Körper spontan ausfallen liess, war sie daher verhältnissmässig grösser. Diese Vereinfachung

des Verfahrens ist auch in anderer Beziehung nicht ohne Interesse, weil sie einerseits die Schwerlöslichkeit des Körpers zeigt, andererseits seine Präexistenz im Urin wahrscheinlicher macht.

Gegen Verwechselungen mit Guanin und Adenin, die vielleicht vorkommen könnten, schützt im ersten Falle das Fehlen der Xanthinreaction, im zweiten das Ausbleiben der Trübung bei 53° und der abweichende Verlauf der Pikrinsäurereaction.

Von dem anderweitigen Inhalt der werthvollen Arbeit des Herrn Balke, auf die ich künftig zurückzukommen hoffe, hebe ich heute nur eine Darstellung von Paraxanthin und Heteroxanthin hervor, die nach meinem Verfahren ohne Schwierigkeiten gelang. Bemerkenswerth ist auch die Gewinnung von Heteroxanthin in gut ausgebildeten Krystallen und eine Stickstoffbestimmung im Heteroxanthin, deren Ergebniss die Formel $C_6H_6N_4O_2$ (Methylxanthin) in erfreulicher Weise bestätigt.

Es bleibt mir noch die Aufgabe, den vorher abgebrochenen Bericht über den Leukämieharn zu vervollständigen. — Nachdem die spontan ausgeschiedenen Xanthinkörper abfiltrirt waren, wurde das neutrale Filtrat von der Schwefelsäure durch Baryt befreit, mit Bleiessig gefällt, der Niederschlag mit kaltem Wasser gewaschen, abgepresst und viermal mit grossen Mengen Wasser ausgekocht. Die entbleiten Extracte wurden mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, die Niederschläge mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die Filtrate stark eingedampft. Auf diese Weise erhielt ich geringe, jedesmal ziemlich gleiche Mengen des unten zu beschreibenden Körpers. Schliesslich wurde der ausgekochte Niederschlag selbst mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die so erhaltene Ausbeute mit den früheren vereinigt.

Ich erhielt auf diesem Wege etwa 0,1 gr. einer weissen, amorphen Substanz von folgendem Verhalten. Sie färbt sich bei der Xanthinprobe nicht, nimmt dagegen bei der Weidel'schen

Reaction eine lebhafte Rothfärbung an. Sie löst sich ziemlich schwer in kaltem, auffallend leicht in warmem Wasser, leicht in Ammoniak, in beträchtlicher Menge in warmem Alkohol von 95 %. Mineralsäuren lösen sie mit Leichtigkeit; die salzsaure Lösung krystallisirt erst nach sehr starkem Einengen. Die ammoniakalische Lösung gibt mit Silbernitrat eine schon in sehr verdünnter Salpetersäure leicht lösliche Fällung. Sublimat und essigsaures Kupfer ergeben Fällungen. Die neutrale wässrige Lösung wird durch Bleiessig gefällt, jedoch nicht bei Gegenwart von Bleizucker; der Niederschlag löst sich beim Anwärmen und fällt beim Erkalten wieder aus.

Die Substanz zeigt also, besonders in ihrem Verhalten zum Bleiessig, Aehnlichkeit mit dem Carnin, unterscheidet sich aber von ihm durch ihre Löslichkeit in Alkohol. Eine Darstellung der Xanthinkörper des Harns in sehr grossem Massstab, mit der ich seit einiger Zeit beschäftigt bin, wird mir vermuthlich Gelegenheit bieten, den Körper in grösseren Mengen zu erhalten, weshalb ich mir das genauere Studium desselben vorbehalten möchte.

Untersuchung der Proteïnsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges.

II.

Von

Carl Th. Mörner in Upsala.

(Der Redaction zugegangen am 1. Juli 1893.)

Die Hornhaut.

Obgleich die Hornhaut, im Ganzen genommen, eine einzige von den übrigen lichtbrechenden Medien getrennte Schicht bildet, lässt sie sich ihrerseits ohne Schwierigkeit in mehrere, anatomisch scharf getrennte Theile zerlegen, nämlich in das Epithellager, die Grundsubstanz (substantia propria corneae) und eine dünne, glasklare Haut, die Descemet'sche Haut (membrana Descemetii seu Demoursii), ein Umstand, welcher nicht ausser Acht gelassen werden darf. Es ist im Gegentheil zur Gewinnung einer klaren Einsicht in die Chemie der Hornhaut nothwendig nach Isolirung der verschiedenen Bestandtheile jedem einzelnen eine besondere chemische Untersuchung zu widmen.

1. Die Grundsubstanz der Hornhaut.

Da die Grundsubstanz den unverhältnissmässig grössten Theil der Hornhaut bildet, hat sie sich, auf Kosten der übrigen Schichten, in überwiegendem Masse die Aufmerksamkeit der Chemisten zugezogen und zwar in solcher Ausdehnung, dass einerseits die Ausdrücke «Hornhaut» und «Grundsubstanz der Hornhaut» als synonyme Begriffe genommen werden und andererseits Angaben über die Chemie der übrigen Schichten kaum in der Litteratur gefunden werden können.

Die erste chemische Untersuchung der Grundsubstanz der Hornhaut wurde von Joh. Müller[1]) (1836), gleichzeitig mit seiner bekannten Untersuchung — der ersten dieser Art — über den hyalinen Knorpel, ausgeführt. Nach Müller's Ansicht besteht die Grundsubstanz in dem Knorpel sowohl wie in der Hornhaut aus einer einzigen, ihrer physikalischen Beschaffenheit nach dem Collagen ziemlich gleichen, aber in chemischer Beziehung verschiedenen Proteïnsubstanz, dem Chondrigen, dessen durch Kochen mit Wasser erhaltene lösliche Modification, das Chondrin, sich durch ihr Verhalten gegen gewisse Fällungsreagenzen von dem Glutin, das durch dieselbe Behandlung aus dem Collagen gewonnen wird, unterscheidet.

Die von Müller hiermit ausgesprochene Ansicht über den einfachen chemischen Bau der Hornhaut- und Knorpel-Grundsubstanzen und über die Identität dieser beiden Substanzen gewann allgemeine Verbreitung und blieb in der Hauptsache unverändert bis gegen Ende der 1870er Jahre.

Man kann es nicht in Abrede stellen, dass die Frage über die chemische Beschaffenheit der Hornhaut-Grundsubstanz in den 40 Jahren, die auf Müller's erste Entdeckung folgten, wenig Fortschritte gemacht hat, und zwar trotzdem neue Untersuchungen nicht ausgeblieben sind. Indem man von Müller's Chondrigen-Chondrintheorie als von einem in der Hauptsache keine nähere Prüfung fordernden Factum ausging, vertiefte man sich in Versuche, in verschiedenen Geweben «Chondrin» nachzuweisen und mit Hülfe von Reactionen von untergeordnetem Werthe den Unterschied zwischen «Chondrin»-Präparaten verschiedener Herstammung zu entdecken, wobei besonders die Möglichkeit in's Auge gefasst wurde, auf diesem Wege die Verschiedenheit zwischen dem Chondrin der Hornhaut und des Knorpels festzustellen; Untersuchungen, deren wesentlicher Werth nothwendig mit der Richtigkeit des Grundes, auf den sie sich alle stützten, der Müller'schen

[1]) Ueber die Structur und die chemischen Eigenschaften der thierichen Bestandtheile der Knorpel und Knochen. Annalen der Physik und Chemie, Bd. 38, S. 295, 1836.

Chondrintheorie, stehen und fallen. Zu dieser Kategorie müssen die später erschienenen Arbeiten von His[1]) (1856), Bruns[2]) (1867) und Fubini[3]) (1876), welche die Chemie der Hornhaut behandeln, geführt werden.

Nach v. Morochowetz'[4]) für die Aufklärung dieser Frage so bedeutungsvoller Untersuchung, welche die Unrichtigkeit der Müller'schen Auffassung bewies, kann den genannten Arbeiten keine grössere Bedeutung zuerkannt werden, warum auch ein näheres Eingehen auf dieselben an dieser Stelle überflüssig wird. Um so wichtiger dagegen ist es, hier an die Hauptzüge der 1877 von Morochowetz veröffentlichten Arbeit zu erinnern.

v. Morochowetz gründete nicht, wie alle seine Vorgänger, seine Versuche über die chemische Natur der Grundsubstanz in der Hornhaut und dem Knorpel ausschliesslich auf das Studium derjenigen Lösungen, die durch anhaltendes Kochen der Gewebe mit Wasser erhalten werden, sondern wandte das natürlichere und weniger eingreifende Verfahren an, die frischen Organe mit einem geeigneten Lösungsmittel, wie Kalk- oder Barytwasser, bei gewöhnlicher Temperatur zu extrahiren. Dadurch gelang es ihm, alle früher als chondrigenhaltig betrachteten Gewebe ohne Ausnahme in zwei verschiedene Bestandtheile zu zerlegen, von denen der eine nach der Extraction einen unlöslichen Rest bildete, der andere in den Lösungsmittel überging.

Was man also nach Müller's Vorbild unter dem Namen «Chondrigen» seit lange für ein chemisches Individuum hielt, war also eine mechanische Mischung zweier ganz verschiedener

---

[1]) Beiträge zur normalen und pathologischen Histologie der Cornea. Basel, 1856.

[2]) Chemische Untersuchungen über die Hornhaut des Auges. Medicin.-chemische Untersuchungen (Hoppe-Seyler's), 1867, S. 260.

[3]) Ueber das Vorkommen des Chondrigens in der Cornea verschiedener Thierarten. Untersuchungen zur Naturlehre des Menschen und der Thiere (Moleschott's), Bd. 11. S. 350, 1876.

[4]) Zur Histochemie des Bindegewebes. Verhandl. des naturhist.-medic. Vereins zu Heidelberg, Bd. 1, 1877.

Substanzen: des Collagen und des Mucin, und ebenso lassen sich die so viel studirten und beachteten «Chondrinreactionen» leicht als durch eine Mischung von Glutin mit Mucin hervorgerufen erklären. Sowohl in der Hornhaut wie im Knorpel sollten also nach v. Morochowetz' Auffassung die Grundsubstanzen aus Collagen und Mucin gebildet sein.

Wenn auch im Detail einige Modificirung nöthig war, so hat doch diese Entdeckung v. Morochowetz' über die zusammengesetzte Natur der Grundsubstanzen, was den Knorpel betrifft, eine überzeugende Bekräftigung durch die Untersuchungen von Landwehr[1]), Krukenberg[2]), dem Verf.[3]) und Schmiedeberg[4]) erhalten.

Was die Richtigkeit dieser Entdeckung in Bezug auf die Hornhaut betrifft, so hat dagegen die Litteratur keine einzige seitdem herausgekommene Arbeit aufzuweisen, was mich veranlasste, die Hornhaut-Grundsubstanz zum Gegenstande erneuerter Untersuchung zu machen.

Nachdem die Richtigkeit der Angaben v. Morochowetz' durch wiederholte und unter verschiedenen Verhältnissen vorgenommene Versuche in der Hauptsache constatirt war, indem die Grundsubstanz sich leicht genug in Collagen und eine mucinartige Substanz theilen liess, galt es, die einzelnen Bestandtheile und ganz besonders die letztgenannte näher zu studiren.

Das Corneamukoïd.

Ueber den mucinartigen Bestandtheil in der Hornhaut-Grundsubstanz, welchen ich aus unten mitzutheilenden Gründen Corneamukoïd nenne, werden keine detaillirten Eigenschaften oder Reactionen in v. Morochowetz' Arbeit mitgetheilt.

---

[1]) Die chemischen Bestandtheile des Knorpels. Zeitschrift für Biologie, Bd. 20, S. 307, 1884.

[2]) Ueber die Bedeutung des thierischen Gummi. Archiv für die gesammte Physiologie (Pflüger's), Bd. 39, S. 193, 1886.

[3]) Chemische Studien über den Trachealknorpel. Skandinavisches Archiv f. Physiologie, Bd. 1, S. 210, 1889.

[4]) Archiv f. experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. 28, S. 354, 1891.

Dass die Substanz aus alkalischer Lösung von Essigsäure gefällt werden kann, dass sie in Bezug auf ihre Fällungsreactionen dem «Chondrin» ähnlich ist, dass sie nach vorgenommenen Analysen, deren Zifferwerthe jedoch nicht angeführt werden, schwefelfrei ist und mit Mucin[1]) nahe übereinstimmt, und dass sie in Uebereinstimmung mit Mucin beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure eine Flüssigkeit bildet, welche auf alkalische Kupferlösung reducirend wirkt, das ist ungefähr Alles, was wir aus v. Morochowetz' Untersuchung erfahren können.

Um ein reines Untersuchungsmaterial zu gewinnen, schnitt ich den mit der Hornhaut zusammenhängenden Theil der Sehnenhaut ab, worauf das Epithellager und die Descemet'sche Haut mit einem Hornmesser abgeschabt und verwahrt wurde, damit jedes für sich besonders untersucht werden konnte. Die also von den daran hängenden Schichten befreiten, aus Grundsubstanz bestehenden Scheiben wurden, nachdem sie in einer Fleischhackmaschine zerkleinert worden, in Partien von 100—300 Stück aufgeschlammt und zwar in dest. Wasser oder in alkalischen Lösungen von bei verschiedenen Versuchen verschiedener Stärke, 0,02proc. Kalilauge, 0,02—0,2proc. Ammoniak, wobei ungefähr 10 cbcm. Flüssigkeit auf jede Hornhaut berechnet wurde. Nach 2—3-tägiger Extraction bei Zimmertemperatur — nur ein einziger Versuch wurde bei 40° C. vorgenommen — wurde der auf ein mehrfach vergrössertes Volumen angeschwollene Rest durch Filtriren entfernt, was immer mit Leichtigkeit vor sich ging und ein klares, dünnflüssiges Filtrat ohne fadenziehende Beschaffenheit ergab. Bei Zusatz von Essigsäure oder verdünnter Salzsäure wurde Corneamukoïd in reicher Menge als weisse, im ersten Augenblick feinflockige Fällung ausgeschieden, die sich bald zu grösseren Flocken vereinigte und nach Verlauf eines Tages am Boden des Gefässes als zusammenhängende, compacte Masse zu finden war.

---

[1]) Ein Ausdruck, der, wie wir jetzt wissen, recht vieldeutig ist, da verschiedene Mucinarten sich bedeutend in der elementaren Zusammensetzung von einander unterscheiden.

Die Fällung wurde in sehr verdünntem Alkali gelöst und wieder mit Essigsäure ausgefällt, um zuletzt, nachdem sie auf dem Filter gewaschen war, theils durch Behandlung mit Alkohol und Aether zur quantitativen Analyse vorbereitet zu werden, theils für qualitative Prüfung in dest. Wasser unter möglichst wenigem Alkalizusatz gelöst zu werden. Hierbei erhielt ich eine klare, neutral reagirende Lösung, die niemals schleimig oder fadenziehend, höchstens bei mässiger Concentration mehr oder weniger dickflüssig war und die bei qualitativer Prüfung folgende Eigenschaften aufwies.

Beim Aufkochen nach oder ohne Kochsalzzusatz wurde niemals eine Trübung bemerkt; die Flüssigkeit verblieb klar oder nahm zuweilen eine geringe Opalescenz an.

Durch sowohl organische wie unorganische Säuren, fast ohne Ausnahme, wurde das Mukoïd in feinen, undurchsichtigen Flocken ausgeschieden, welche in einem Ueberschuss von unorganischen Säuren gelöst werden konnten, ohne bei einem weiteren Ueberschuss wieder auszufallen, in einem Ueberschuss von organischen Säuren dagegen sehr schwer löslich waren. Besonders möchte ich hervorheben, dass die Lösung durch Gerbsäure gefällt wird. Ein Zusatz von Neutralsalzen, wie z. B. Kochsalz, Natriumacetat, Ferrocyankalium, verhindert die Fällung vollständig und vermag die Fällungen, die mit Säuren hervorgebracht sind, wieder zu lösen. Die mit einer Säure ausgefällte und durch Waschen von der Säure befreite Substanz reagirt deutlich sauer, ist in Wasser unlöslich, aber wird mit Leichtigkeit selbst in äusserst verdünnter alkalischer Flüssigkeit, z. B. in 0,005 proc. Kalilauge, gelöst.

Mit mehreren Metallsalzen gibt die Lösung der Substanz eine voluminöse, grobflockige Fällung, z. B. mit Zinnchlorür, Platinachlorid, Merkuronitrat, Kupfersulphat, basischem Bleiacetat, Eisenchlorid, Alaun; von anderen wird sie nicht gefällt, wie von Silbernitrat, Quecksilberchlorid und neutralem Bleiacetat.

Beim Erwärmen mit Millon's Reagens, Adamciewic's Reagens, Salpetersäure, concentr. Salzsäure wurden dieselben Farbereactionen erhalten, die den Eiweisskörpern zukommen,

wenn auch von bedeutend geringerer Intensität. Mit Kalilauge und Bleiacetat versetzt, nimmt die Flüssigkeit beim Erwärmen eine dunkelbraune oder undurchsichtig schwarze Farbe an; die Substanz enthält also lose gebundenen, «bleischwärzenden» Schwefel in reichlicher Menge.

Nach einem Zusatz von Salzsäure zu 5 % und Erwärmen der Flüssigkeit im Wasserbad gibt die Trommer'sche Probe eine reducirende Substanz an. Abgespaltene Schwefelsäure kann dagegen nicht mit Chlorbaryum in der salzsauren Flüssigkeit nachgewiesen werden (vgl. Chondromukoïd).

Bei Digestion der mit Salzsäure zu 0,4 % sauer gemachten und mit Pepsin versetzten Flüssigkeit entsteht keine nucleïnartige Fällung.

Die elementare Zusammensetzung wurde durch Analyse von einer Anzahl Präparate gewonnen, welche durch Ausfällen der Substanz mit Essigsäure oder Salzsäure hergestellt waren [1].

Präp. No. I. Extraction der Hornhaut mit 0,05 proc. Ammoniak während 3 Tagen; die Substanz mit Essigsäure 2 mal gefällt.

0,168 gr. = 12,75 % Stickstoff,
0,886 gr. = 2,02 % Schwefel,
0,2795 gr. = 49,96 % Kohlenstoff,
0,2795 gr. = 6,94 % Wasserstoff.

Präp. No. II. 0,075 proc. Ammoniak, 2 Tage; 3 mal Salzsäure.

0,200 gr. = 12,63 % Stickstoff.

Präp. No. III. 0,1 proc. Ammoniak, 1 Tag; 2 mal Essigsäure.

0,146 gr. = 12,74 % Stickstoff.
0,2805 gr. = 50,36 % Kohlenstoff,
0,2805 gr. = 7,01 % Wasserstoff.

Präp. No. IV. 0,2 proc. Ammoniak, 3 Tage; 3 mal Salzsäure.

0,239 gr. = 12,83 % Stickstoff.

Präp. No. V. 0,02 proc. Kalilauge, 3 Tage; 2 mal Salzsäure.

0,173 gr.
0,173 gr. } = 12,66 % Stickstoff,
1,283 gr. = 2,12 % Schwefel.

Präp. No. VI. Dest. Wasser, einen Tag; 2 mal Essigsäure.

0,1455 gr. = 12,95 % Stickstoff,
0,813 gr. = 2,08 % Schwefel.

---

[1] Der Aschegehalt belief sich auf 0,2—0,4 %.

Präp. No. VII. Dest. Wasser, einen Tag bei 40° C; 3mal Essigsäure.
0,183 gr. = 12,97 % Stickstoff.

Woraus als Mittelwerth für die Zusammensetzung der Substanz erhalten wurde:

12,79 % Stickstoff,
2,07 % Schwefel,
50,16 % Kohlenstoff,
6,97 % Wasserstoff.
28.01 % Sauerstoff.

Obgleich das Verfahren bei der Herstellung absichtlich variirt wurde, zeigen die aus verschiedenen Präparaten erhaltenen analytischen Werthe unter einander Uebereinstimmung genug, um die Individualität der Substanz ausser Zweifel zu stellen.

Aus den allgemeinen Eigenschaften und qualitativen Reactionen, welche, wie oben angeführt, der in Frage stehenden Substanz einerseits, ihrer elementaren Zusammensetzung (relative niedriger Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalt) andererseits zukommen, geht mit aller wünschenswerthen Klarheit ihre Zusammengehörigkeit mit früher bekannten Mucinsubstanzen hervor, wenn sie auch nicht, mit Berücksichtigung ihrer physikalischen Eigenschaften, zur Gruppe der echten Mucinstoffe geführt werden kann, sondern den sogenannten Mukoïdsubstanzen zugehört. Aus diesem Grunde scheint es mir, dass diese Substanz passend Corneamukoïd genannt werden kann.

Nachdem ihre Eigenschaft als Mukoïd also an den Tag gelegt ist, wäre es zunächst von Interesse, festzustellen, ob sie eine für die Hornhaut charakteristische Substanz oder möglicher Weise mit einem früher bekannten Mukoïd anderer Herstammung identisch ist. Bisher näher untersuchte Mukoïde sind: Pseudomucin aus Ovarialflüssigkeiten (Hammarsten[1]), Chondromukoïd im Knorpel (Verf.[2]), eine in gewissen Ascites-

---

[1]) Ueber Metalbumin und Paralbumin, ein Beitrag zur Chemie der Kystomflüssigkeiten. Jahresbericht über die Fortschritte der Thier-Chemie, Bd. 2, S. 11, 1882.

[2]) Loc. cit.

flüssigkeiten von Hammarsten[1]) nachgewiesene Mukoïdsubstanz, und der vom Verfasser analysirte Glaskörpermukoïd.

Von Pseudomucin unterscheidet sich Corneamukoïd unter anderem durch Fällbarkeit von Essigsäure, höheren Stickstoffgehalt (12,79 % gegen 10,28 %) und höheren Schwefelgehalt (2,07 % gegen 1,25 %).

Obgleich mit Chondromukoïd in Bezug auf den Stickstoffgehalt (12,79 % resp. 12,58 %) und einem ungewöhnlich reichen Schwefelgehalt (2,07 % resp. 2,42 %) nahe übereinstimmend, unterscheidet sich der Corneamukoïd durch die Art, wie der Schwefel gebunden ist, indem kein Theil des Schwefels des Corneamukoïds durch Kochen mit einer Mineralsäure abgespalten werden kann, d. h. sich in Aetherschwefelsäurebindung befindet, welches dagegen mit fast 3/4 des Schwefels in der Chondromukoïdsubstanz der Fall ist; ausserdem herrscht ein bedeutender Unterschied im Kohlenstoff-Gehalt (Differenz beinahe 3 %), und ein etwas abweichendes Verhalten zu Reagenzen.

In Bezug auf Ascitesmukoïd ist der Stickstoffgehalt beinahe derselbe, der Kohlengehalt erwies sich um 1,2 % höher als in Corneamukoïd, doch ist es augenblicklich unmöglich, eine bestimmte Ansicht über die Identität resp. Nicht-Identität dieser Substanzen zu äussern, da bis jetzt keine Schwefelbestimmung der Ascitesmukoïdsubstanz ausgeführt worden ist.

Auch von dem unten beschriebenen Glaskörpermukoïd weicht der Corneamukoïd mit bedeutender Ungleichheit im Schwefelgehalt ab.

Also zeichnet sich der Corneamukoïd von allen in dieser Beziehung bisher bekannten Mucinsubstanzen[1]) dadurch aus, dass es sämmtliche an Schwefelreichthum[2]) übertrifft, und sollte daher für einen der Hornhaut-Grundsubstanz charakteristischen Bestandtheil gehalten werden.

---

[1]) Mit Ausnahme von Chondromukoïd.

[2]) Wie v. Morochowetz zu seiner Angabe, dass die mucinartige Substanz der Cornea schwefelfrei sei, gelangt ist, ist mir unmöglich zu verstehen.

Was nach diesem Vergleiche besonders hervorgehoben zu werden verdient, ist, dass die Mukoïdstoffe der Hornhaut-Grundsubstanz und die des Knorpels nicht identificirt werden können, sondern wesentlich verschieden sind: dieser Umstand an und für sich, abgesehen davon, dass die Knorpel-Grundsubstanz nach neueren Untersuchungen eine ihr besonders eigene Substanz, die Chondroitsäure, enthält, erlaubt uns nicht, die Grundsubstanzen der Hornhaut und des Knorpels als zwei vom chemischen Gesichtspunkte aus gleichartige Bildungen anzusehen, wozu nicht nur Joh. Müller auf seinem primitiven Standpunkte, sondern auch v. Morochowetz, nach der Entdeckung des Collagen und des «Mucin» in beiden, sich berechtigt glaubten.

Weitere Verschiedenheiten zwischen den Mukoïdsubstanzen der Hornhaut und des Knorpels traten beim Untersuchen ihrer Zersetzungsproducte hervor. Während das Chondromukoïd beim Einwirken von Säuren oder Alkalien unter anderen Zersetzungsproducten Albuminat in nicht unbedeutender Menge gibt, wie es auch der Fall ist mit Submaxillarismucin (Hammarsten[1]), gibt das Corneamukoïd bei der Zersetzung kein Albuminat, wie aus mehreren Versuchen hervorging.

Reines Corneamukoïd wurde behandelt mit: 1) gesättigter Barythydratlösung während 12 Stunden bei Zimmertemperatur; 2) 5proc. Kalilauge, 2 Tage, bei Zimmertemperatur; 3) 5proc. Kalilauge, 14 Tage, bei Zimmertemperatur; 4) kochende 1proc. Kalilauge während einer Stunde, und 5) kochende 2proc. Salzsäure während einer Stunde. Beim Neutralisiren der also erhaltenen Lösungen entstand niemals ein Niederschlag und im Ganzen genommen konnte weder in den neutralisirten Lösungen direkt, noch nachdem sie durch Dialyse von den Salzen befreit waren, eine Substanz gefunden werden, welche durch Säuren (oder Salzsäure und Ferrocyancalium) fällbar war, wogegen Gerbsäure, Quecksilberjodkalium und Salzsäure eine reichliche Fällung ergaben.

Eine nähere Prüfung der also erhaltenen, durch Säuren nicht fällbaren Umwandlungs- oder Zersetzungsproducte des

---

[1]) Ueber das Mucin der Submaxillardrüse. Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. 12, S. 163, 1887.

Corneamukoïds ist nicht von mir vorgenommen worden. Nur ein unbedeutender Versuch in dieser Richtung mag angeführt werden. Die neutralisirte Flüssigkeit des oben angeführten Versuchs 3, welche sich bei direct angestellter Trommer-scher Probe als von reducirenden Substanzen frei erwies, aber nachdem sie kurze Zeit mit Salzsäure erwärmt war, eine starke Reaction gab, wurde mit Gerbsäure im Ueberschuss gefällt. Nachdem der Ueberschuss an Gerbsäure mit Bleiacetat, der Rest davon mit Schwefelwasserstoff entfernt worden war, wurde das schliessliche Filtrat, nachdem es concentrirt worden war, mit verdünnter Salzsäure gekocht und mit der Trommer'schen Probe geprüft. Nicht eine Spur von Reduction zeigte sich dabei. Es ist aber klar, dass das durch Einwirkung von Alkali auf die Corneamukoïdsubstanz erhaltene Umwandlungs- resp. Spaltungsproduct, welches die erste Quelle der reducirenden Substanz bildet, eine durch Gerbsäure vollständig fällbare Substanz ist, worin auch eine Abweichung von Chondromukoïd liegt, bei dessen Zersetzung der reducirende Atomcomplex in der durch Gerbsäure unter keinen Umständen fällbaren Chondroïtsäure enthalten ist.

Obgleich das Corneamukoïd erst durch v. Morochowetz als eine mucinartige Substanz erkannt wurde, ist es doch zweifellos, dass es bei einer früheren Untersuchung (1867) bemerkt worden ist.

Bruns[1]), welcher die Müller'sche Chondrintheorie in unveränderter Gestalt annahm, gibt nämlich beiläufig an, dass er aus dem Wasserextract der Hornhaut beim Zusatz von Essigsäure eine im Ueberschuss schwer lösliche Fällung erhalten hat, die er ohne nähere Beweisführung für einen Eiweisskörper, Alkalialbuminat, erklärt.

Da die Natur der Corneamukoïd-Substanz auf diese Weise, in Folge ungenügender Untersuchung, nicht erkannt wurde, zog sie sich dieses Mal kein grösseres Interesse zu, und ihre Bedeutung für ein richtiges Erkennen der Grundsubstanz der Hornhaut im Ganzen wurde von Bruns übersehen.

---

[1]) Loc. cit.

Das Collagen.

In ungewöhnlich reinem Zustande erhält man diese Substanz durch fortgesetztes Auslaugen der Hornhaut-Grundsubstanz mit schwach alkalischen Flüssigkeiten, wobei die von der Bereitung des Corneamukoïd übriggebliebenen Reste zur Anwendung gelangen. Nachdem die Reste nach Extraction bei Zimmertemperatur unter öfterem Wechseln der Flüssigkeit keine durch Essigsäure fällbare Substanz mehr abgaben, wurden sie durch Digestion mit dest. Wasser erst bei Zimmertemperatur, später bei 30—40° C. vollständig von Alkali befreit. Die rein weisse, aufgeschwollene und geleeartig zitternde Masse[1]) wurde durch stundenlanges Erwärmen mit dest. Wasser bei 105—110° C. in eine klare, dünnflüssige, bei Abkühlung gelatinirende Lösung verwandelt, die nach Abfiltriren eines äusserst unbedeutenden ungelösten Restes (der Hornhautzellen) theils direct auf ihr Verhalten zu qualitativen Reagenzen geprüft, theils zu Lamellen eingetrocknet und in Bezug auf ihre elementare Zusammensetzung untersucht wurde..

Da es sich hier um eine in den meisten Körpern vorkommende Substanz handelt, deren qualitative Reactionen in jedem Lehrbuch der physiol. Chemie angegeben sind, verzichte ich darauf, sie an dieser Stelle zu wiederholen. Es genügt, daran zu erinnern, dass das aus der Hornhaut gewonnene Glutin in allen qualitativen Reactionen, sowohl den negativen wie den positiven, mit dem übereinstimmt, was man bereits von Glutin anderen Ursprungs kennt. Dagegen schien es mir nicht ohne Interesse zu sein, einige der analytischen Bestimmungen des Hornhaut-Collagens resp. -Glutins anzuführen:

Präp. No. I. Collagen. Die zur Extraction angewandte Flüssigkeit: 0,05 proc. Kalilauge.

0,285 gr.
0,180 » } = 16,80 % Sticktoff,
1,810 » = 0,31 % Schwefel,
(0,791 » = 0,32 % Asche.)

1) In einigen Fällen wurde ein Theil davon abgenommen, um nach Alkohol- und Aetherbehandlung analysirt zu werden.

Präp. No. II. Collagen. 0,1 % Ammoniak.

0,172 gr. = 17,03 % Stickstoff,
0,638 » = 0,29 % Schwefel,
(0,610 » = 0,54 % Asche.)

Präp. No. III. Glutin, aus Collagen des vorigen Präparats (0,1 % Ammoniak) hergestellt.

0,1325 gr. = 17,02 % Stickstoff,
1,404 » = 0,31 % Schwefel,
(0,488 » = 0,62 % Asche.)

Präp. No. IV. Glutin. 0,05 proc. Kalilauge.

0,148 gr. }
0,119 » } = 17,07 % Stickstoff,
(0,4165 » = 0,37 % Asche.)

Präp. No. V. Glutin. 0,2 proc, Ammoniak.

0,1805 gr. = 16,81 % Stickstoff,
(— » = 1,95 % Asche.)

Präp. No. VI. Glutin. 1 proc. Ammoniak.

0,169 gr. = 16,97 % Stickstoff,
(— » = 0.98 % Asche.)

Mittelwerth: 16,95 % Stickstoff,
0,30 % Schwefel.

In recht bedeutendem Grade ist der hier für Collagen resp. Glutin gefundene Schwefelgehalt geringer als der, den man allgemein in Lehrbüchern angegeben findet. So schreibt z. B. Gorup-Besanez[1]): «Der Schwefelgehalt des Glutins wurde zu 0,56 % gefunden» und Hammarsten in der deutschen Auflage seines Lehrbuchs: «Der Leim enthält etwa 0,6 % Schwefel».

In Bezug auf den Stickstoffgehalt nimmt das Hornhaut-Glutin (mit ca. 17 %) die Mitte zwischen dem Glutin der Sehnen, Hausenblase und Knochen (mit ca. 18 %) und dem Knorpel-Glutin (mit ca. 16 %) ein.

Es fehlt nicht an älteren Angaben, dass man aus der Grundsubstanz der Hornhaut verschiedenartige Eiweisskörper

[1]) Lehrbuch der physiologischen Chemie (1878), S. 647.

ausziehen kann. So liest man in Kühne's[1]) Lehrbuch (1868): «Wässerige Extracte der Cornea enthalten sehr viel Paraglobulin, das wahrscheinlich aus den Zellen stammt»; und in Gorup-Besanez'[2]) (1878): «Nach A. Schmidt enthält das Wasserextract der Hornhaut fibrinoplastische Substanz und ruft in Fibrinogen enthaltenden Transsudaten Gerinnung hervor». Bruns, dessen Angaben über das Vorkommen von Alkali-Albuminat im Wasserextract der Hornhaut oben bereits behandelt worden sind, gibt ausserdem Myosin als einen Bestandtheil der Hornhaut-Grundsubstanz an und verlegt dasselbe mit Bestimmtheit in die Zellen («Hornhautkörperchen oder Zellen»).

Wenn man die Vorsicht beobachtet, die Hornhaut-Grundsubstanz und das Epithellager jedes einzeln zu untersuchen, so braucht man nur wenige Versuche anzustellen, um über die Unrichtigkeit der Angaben, dass die Eiweisskörper in der Grundsubstanz der Hornhaut incl. der Zellen vorkommen, in's Klare zu gelangen; zugleich tritt der Grund dieses Irrthums deutlich zu Tage: bei früheren Untersuchungen ist die Nothwendigkeit, die Grundsubstanz vom Epithellager zu befreien, übersehen worden. Durch wiederholte Versuche konnte ich mich davon überzeugen, dass sich in dem Extract der reinpräparirten Grundsubstanz, einerlei ob derselbe mit dest. Wasser, Kochsalzlösung oder schwachen Alkalien hergestellt ist, kein einziger Eiweisskörper nachweisen lässt oder höchstens nur spurweise, wogegen das Epithellager eine reichliche Menge davon enthält, was natürlich in den Extract der ganzen Hornhaut übergeht, wenn nicht das Epithellager vor der Extraction vollständig entfernt wird[3]).

Unter solchen Umständen ist es nicht zu verwundern, dass man der Grundsubstanz, dem am meisten in die Augen fallenden Theil, Bestandtheile zugeschrieben hat, die in Wirklichkeit dem in Folge seiner geringen Ausdehnung nicht beachteten Epithellager zugehören.

---

[1]) Lehrbuch der physiologischen Chemie (1868), S. 386.

[2]) Loc. cit.

[3]) Diese Bedingung ist weder von Kühne, Schmidt noch Bruns angedeutet worden.

Wir können also vorläufig die Frage über die Eiweisskörper in der Hornhaut bei Seite lassen, um beim Behandeln der Bestandtheile des Epithellagers darauf zurückzukommen. Auch nach Chondroïtsäure suchte ich mit negativem Resultat.

Kürzlich, beim Betrachten der Hornhaut-Grundsubstanz im Ganzen, haben wir auf zwei Proteïnsubstanzen unsere Aufmerksamkeit zu richten: auf Collagen und Corneamukoïd, von denen das erstere das histologisch nachweisbare, dichte Netzwerk äusserst feiner Fibrillen bildet, das letztere in einer concentrirten Lösung das fibrilläre Netzwerk durchtränkt. Dass das Corneamukoïd, wenigstens zum wesentlichen Theil, wirklich als eine in Wasser leicht lösliche Alkaliverbindung auftritt, geht daraus hervor, dass es ebenso leicht in der Extractionsflüssigkeit zu finden ist, wenn die Hornhaut mit einfachem dest. Wasser extrahirt, wie wenn sie mit einem schwachen Alkali behandelt wird.

Bei längerem Kochen mit Wasser löst sich die ganze Grundsubstanz, welche Lösung, wie Müller zuerst beobachtet hat, sich durch Reagenzen fällen lässt, die auf eine gewöhnliche Leim-(Glutin-)Lösung nicht einwirken. Hier auf diese Reactionen einzugehen, wäre zwecklos, da sie in jedem älteren Lehrbuch zu finden sind, und schon nach v. Morochowetz' Untersuchung und besonders nach der hier vorliegenden mit Bestimmtheit für ein Mischungsphänomen erklärt werden können und somit das Interesse jetzt nicht mehr zu fesseln vermögen.

Um eine Vorstellung von dem Mengeverhältniss zwischen Collagen und Corneamukoïd zu erhalten, wurde der Stickstoff- und Schwefelgehalt der Grundsubstanz[1]) bestimmt. Da die beiden Substanzen nämlich eine so grosse Verschiedenheit in ihrem Stickstoff- und Schwefelgehalt besitzen, erwies sich dieses Mittel als ebenso einfach wie zuverlässig:

Präp. No. I. 0,200 gr. = 16,04 % Stickstoff,
(— » = 2,08 % Asche.)

---

[1]) Die reinpräparirte Substantia propria wurde getrocknet, pulverisirt, und dann mit Alkohol und Aether extrahirt.

Präp. No. II.	0,171 gr. / 0,1565 »	=	16,34 % Stickstoff,
	0,8745 »	=	0,63 % Schwefel,
	(0,419 »	=	1,67 % Asche).
Präp. No. III.	0,187 gr. / 0,1735 »	=	16,25 % Stickstoff,
	1,067 »	=	0,63 % Schwefel.
	(0,615 »	=	1,79 % Asche).

Mittelwerth: 16,21 % Stickstoff,
0.63 % Schwefel.

Nimmt man den Stickstoffgehalt zum Ausgangspunkt der Berechnung, so findet man, dass die Grundsubstanz zu 82,2 % aus Collagen, zu 17,8 % aus Corneamukoïd gebildet wird; geht man dagegen vom Schwefelgehalt aus, so erhält man folgende Werthe: 81,2 % resp. 18,8 %. Die auf verschiedene Weise erlangten Werthe können so einander controlliren, da sie gut mit einander übereinstimmen. Das Collagen ist also an Menge weit überwiegend und bildet rund $^4/_5$ der ganzen Grundsubstanz.

Anhang. Wenn ich auch damit aus dem Rahmen der lichtbrechenden Medien hinaustrete, will ich doch, in Folge des engen anatomischen Zusammenhanges, in welchem die Hornhaut-Grundsubstanz und die Sehnenhaut (sclera) stehen, in grösster Kürze einige Versuche über das letztere Gewebe mittheilen, besonders da eine Angabe hierüber im Allgemeinen in der Litteratur nicht zu finden ist. Durch Anwenden desselben Verfahrens, wie bei der Untersuchung der Hornhaut, konnte auch die Sehnenhaut in zwei Bestandtheile zerlegt werden: eine Mukoïdsubstanz, die wenigstens in qualitativer Hinsicht keine Abweichung von Corneamukoïd zeigte, und Collagen, das ein Glutin mit typischen Reactionen und ungefähr demselben Stickstoffgehalt wie Corneaglutin gab.

Präp. I. Skleraglutin. Extractionsflüssigkeit: 1 proc. Ammoniak.

0,216 gr. = 17,22 % Stickstoff,
(0,583 » = 1.89 % Asche).

Soweit man also aus dieser preliminären Untersuchung urtheilen kann, scheint die Art der Proteïnsubstanzen in der

Sehnenhaut dieselbe zu sein wie die der Hornhaut. In Betreff des Verhältnisses zwischen Collagen und Mukoïd dürfte dagegen eine Verschiedenheit insoweit herrschen, als das Mukoïd der Sclera in geringerer Menge vorkommt. Eine Stickstoffbestimmung der ganzen Sehnenhaut gab nämlich folgendes Resultat:

0,177 gr. = 16,66 % Stickstoff,
(0,6575 » = 0,84 % Asche).

Vorausgesetzt, dass das Scleramukoïd mit dem Corneamukoïd identisch oder wenigstens an Stickstoffgehalt gleich ist, würden die Proteïnstoffe der Sehnenhaut sich also auf 13 % Mukoïd und 87 % Collagen vertheilen und das Collagen also ungefähr $^7/_8$ des Ganzen ausmachen.

2. Das Epithellager der Hornhaut.

Das Epithellager, welches die äussere Oberfläche der Hornhaut bekleidet und das aus mehrschichtigem Pflasterepithel gebildet wird, ist bis jetzt nicht allein niemals der Gegenstand einer besonderen chemischen Untersuchung gewesen, sondern ist auch bei Untersuchungen der Hornhaut-Grundsubstanz in einem solchen Grade übersehen worden, dass daraus wirkliche Irrthümer entsprungen sein mögen.

Ohne Zweifel muss man auch zugestehen, dass eine Untersuchung des Epithellagers an und für sich wenig Interessantes bot und dass sie eigentlich nur dadurch einen Werth erhielt, dass sie gewisse Angaben über das Vorkommen von Eiweisskörpern in der Grundsubstanz der Hornhaut in neue Beleuchtung setzte.

Das zur Untersuchung nöthige Material wurde beim Präpariren der Hornhaut-Grundsubstanz als Abfallsproduct in nicht unbedeutender Menge gewonnen und bildete eine grauweisse, breiige Masse. Durch Extraction der Masse mit 0,01 proc. Ammoniak (1 cbcm. pro Hornhaut) bei Zimmertemperatur und Filtriren der Mischung nach einigen Stunden wurde ein Filtrat erhalten, das bei vorsichtigem Zusatz von verdünnter Essigsäure oder bei Einleiten von Kohlensäure eine reichliche, feinflockige Fällung gab. Nachdem die Fällung gewaschen war,

wurde sie mit so wenig wie möglich Alkali in eine klare Lösung verwandelt, die folgendes Verhalten zeigte:

Die Lösung coagulirte beim Kochen und gab die gewöhnlichen Fällungs- und Färbereactionen des Eiweiss. Bei Sättigung mit Magnesiumsulfat bei 30° C. oder beim Zusatz des gleichen Volumens gesättigter, neutral reagirender Ammoniumsulfatlösung entstand flockige Fällung und im Filtrat hiervon konnte kein Eiweiss nachgewiesen werden. Sättigung mit Kochsalz bei Zimmertemperatur brachte eine sparsame Fällung hervor.

Die durch verdünnte Essigsäure oder Kohlensäure hervorgerufene Fällung war äusserst leicht löslich im geringsten Ueberschuss an Essigsäure, ebenso wie sie beim Zusatz eines Neutralsalzes, z. B. Kochsalz, Natriumacetat, augenblicklich bis auf einen sehr unbedeutenden Rest gelöst wurde. Die Coagulationstemperatur für eine solche Lösung (¼ gesätt. NaCl) wurde bei drei verschiedenen Versuchen auf 75°, 76° resp. 78° C. bestimmt.

Mit Salzsäure zu 0,2 % und Pepsin versetzt ergab die Lösung unter Digestion bei 40° C. keine Fällung (Nucleïn).

Die Stickstoffbestimmung der mit Essigsäure ausgefällten Substanz (0,180 gr.) ergab 15,58 % Stickstoff.

Dass es sich hier um eine Globulinsubstanz handelt, ist somit klar, und was die Art derselben betrifft, dürfte sie mit grosser Wahrscheinlichkeit für identisch mit Paraglobulin gehalten werden. Unter den Eiweisskörpern des Epithellagers nimmt dieses Globulin durch seine auffallende Reichlichkeit den vornehmsten Platz ein und, da es beim Auslaugen der ganzen Hornhaut in das Extract übergeht, kann man mit Bestimmtheit annehmen, dass dies die Veranlassung zu den in der Litteratur befindlichen Angaben über das Vorkommen von Paraglobulin in der Grundsubstanz oder den Zellen der Hornhaut gewesen ist (s. S. 226).

Wurde die Epithelmasse während eines Tages mit ¼ gesättigter Kochsalzlösung extrahirt, so erhielt man ein Filtrat, aus welchem durch Verdünnen mit Wasser eine äusserst geringe Menge grauweissen, fadenziehenden Schleimes von eigenthümlichem Aussehen ausgefällt wurde. Eine nähere

Untersuchung dieser Substanz war in Folge ihrer geringen Quantität unmöglich zu bewerkstelligen. So viel liess sich jedoch mit Leichtigkeit feststellen, dass sie sich bei Zusatz von ein wenig Kochsalz klar löste, dass diese Lösung beim Aufkochen coagulirte und beim Sättigen mit Kochsalz sich aufs Neue in grobfaserigen Flocken ausschied, wodurch es sicher scheint, dass hier ein Globulin vorliegt, welches in Hinsicht auf das Aussehen der Fällung und deren Verhalten zu Kochsalz an Myosin erinnert, wenn sich auch die Identität nicht feststellen liess.

Es scheint mir unzweifelhaft, dass Bruns[1]) diese dem Epithellager zugehörige Substanz unter dem Namen Myosin versteht, und, da er es versäumt hat, das Epithellager bei der Untersuchung der Grundsubstanz zu entfernen, den Zellen der Grundsubstanz zuschreiben zu können meint.

Bruns schreibt hierüber: «Der Nachweis des Myosins, wie er wiederholt ausgeführt wurde, geschah in folgender Weise: die sorgfältig von der Sclerotica abgetrennten und fein zerschnittenen Corneae werden mit gesättigter Chlornatriumlösung 24 Stunden stehen gelassen, darauf filtrirt und mit Chlornatriumlösung ausgewaschen. Der Rückstand wird ausgepresst, mit wenig destillirtem Wasser 24 Stunden stehen gelassen und dann völlig klar abfiltrirt. Das Filtrat gibt mit grosser Menge destillirten Wassers einen Niederschlag, der in nicht concentrirter (nicht über 10% ClNa enthaltender) Chlornatriumlösung und in (1 pr. Mille) salzsäurehaltigem Wasser löslich ist. In Letzterem geht das Myosin allmälig in Syntonin über: die Lösung gibt einen Niederschlag mit kohlensaurem Natron und ist unlöslich in Chlornatriumlösung. Ausser dem Myosin, das also von den Hornhautkörperchen stammt, liess sich noch ein zweiter Eiweissstoff nachweisen.... Dieser Eiweisskörper stellt ein Alkali-Albuminat dar,...»

Unter genauer Befolgung des von Bruns vorgeschriebenen Verfahrens habe ich beim Behandeln der vom Epithel befreiten Grundsubstanz keine Spur von «Myosin» zu entdecken vermocht, nicht einmal in einem Material von mehreren Hundert

---

[1]) Loc. cit.

Hornhäuten; dagegen ist es mir bei Benutzung der ganzen Hornhaut oder des Epithels allein immer gelungen. Uebrigens geht aus Bruns eigener Darstellung hervor, dass er ebenso wenig wie der Verfasser die Identität dieser Globulinsubstanz mit Myosin festgestellt haben kann, da es erst unter Benutzung eines unerhört reichlichen Materials möglich wäre.

In dem Epithellager der Hornhaut gibt es also zwei Globulinsubstanzen. Die eine, wahrscheinlich identisch mit Paraglobulin, ist reichlich repräsentirt, die andere, wenn sie auch infolge ihrer charakteristischen Beschaffenheit leicht nachzuweisen ist, kommt dagegen nur in äusserst geringer Menge vor.

Wenn auch diese Beobachtungen an und für sich unwichtig sind, so sind sie doch insofern beachtenswerth, als sie deutlich zeigen, wie nothwendig es ist, bei physiologisch-chemischen Untersuchungen die Zerlegung der Gewebe in einzelne Bestandtheile, soweit ihre anatomische Beschaffenheit und die zu Gebote stehenden Hülfsmittel es nur irgend gestatten, zu treiben, um Missverständnissen vorzubeugen.

3. Die Descemetische Haut.

Nachdem zwei verschiedene Lager der Hornhaut, die Grundsubstanz und das Epithellager, jedes für sich, behandelt worden sind, wäre es am natürlichsten, nun zur Betrachtung des noch fehlenden Theiles, der Descemetischen Haut, überzugehen. Indessen verriethen, wie wir in einer folgenden Abtheilung erfahren werden, die Descemetische Haut und die Kapselmembrane der Linse eine vom chemischen Gesichtspunkte so unverkennbare Aehnlichkeit, und haben so viel mit einander gemeinsam, dass sie am besten in einem gemeinsamen Kapitel abgehandelt werden. Auch in histologischer Hinsicht weisen sie, wie bekannt, Uebereinstimmung mit einander auf, und sind deshalb mit einigen anderen gleichartigen Bildungen zur Gruppe der sogen. Glasmembranen vereinigt worden.

Die Descemetische Haut und die Linsenkapsel können deswegen am besten in einer gemeinsamen Rubrik: «Die Glasmembranen der lichtbrechenden Medien» vereinigt werden, über welche im nächsten Abschnitt berichtet werden soll.

Untersuchung der Proteïnsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges.

III.

Von

Carl Th. Mörner in Upsala.

(Der Redaction zugegangen am 3. Juli 1893.)

Die Glasmembranen der lichtbrechenden Medien.

Gering ist die Aufmerksamkeit, die von Seiten der Chemiker diesen Gebilden gewidmet worden, und ihre chemische Natur ist daher so gut wie unbekannt. Ausschliesslich in Hinsicht auf ihr Verhalten bei Trypsindigestion haben Ewald und Kühne[1]) (1877), sowie Sasse[2]), ein Schüler Kühne's, (1879) die Descemetsche Haut, Chittenden[3]), ein anderer Schüler Kühne's, (1880) die Kapselmembrane der Linse in Prüfung genommen und auf Grund dabei beobachteter Verschiedenheiten constatirt, dass dieselben nicht zu den leimgebenden Geweben zu rechnen sind. Es zeigte sich nämlich, dass sie bei Digestion mit alkalischer Trypsinlösung direct

---

[1]) Die Verdauung als histologische Methode. Verhandlungen des naturhist.-medicinischen Vereins zu Heidelberg, Bd. 1 (1877).

[2]) Zur Chemie der Descemetschen Membran. Untersuchungen aus dem Physiologischen Institute der Universität Heidelberg, Bd. 2, S. 433, (1887).

[3]) Zur Histochemie der Membranae propriae und der Glashäute. Untersuchungen aus dem Physiologischen Institute der Universität Heidelberg, Bd. 3, S. 188 (1880).

löslich waren, während leimgebende Gewebe in natürlichem Zustande in derselben nicht löslich sind und erst nach dem Process des Kochens gelöst werden können. Wenn man die Beobachtung Sasse's hinzufügt, dass die Descemet'sche Haut, im Widerspruch mit dem durch Froriep constatirten Verhalten des Sarcolemma, nicht durch Kochen mit 1 proc. Salicylsäure angegriffen wird und dass sie bei Xantoproteïnsäure-, Biuret- und Millon'schen Eiweiss-Reactionen schöne Färbungen gibt, sowie ferner die einander diametral entgegengesetzten Aussprüche von Mensonides[1]) (1848) und Strahl[2]) (1852) über das Verhalten der Linsenkapsel beim Kochen mit Wasser, indem Mensonides erklärt, dass dieselbe bis zu 48 Stunden gekocht werden kann, ohne sich aufzulösen, wogegen Strahl findet, dass sie sich schon nach wenigen Stunden in kochendem Wasser zu einer nicht gelatinirenden Lösung[3]) auflöst, so haben wir damit Alles zusammengestellt, was wir für den Augenblick über das chemische Verhalten dieser Glasmembrane wissen.

Was sicher zum grössten Theil die Schuld an der geringen Anzahl und der Unvollständigkeit der diesbezüglichen Untersuchungen trägt, ist der Umstand, dass man nur mit grosser Mühe eine genügende Menge Untersuchungsmaterial beschaffen kann, da nämlich das erforderliche Präpariren des Materials im Verhältniss zu der geringen Ausbeute[4]) viel Zeit und Geduld erfordert. Dagegen kann man sich darauf verlassen, bei richtigem Verfahren ein reines, von fremden Beimengungen vollkommen freies Material zu erhalten.

Ob es sich nun um die Descemet'sche Haut oder die Linsenkapselmembrane handelt, so erwies es sich in jedem Falle als nothwendig, das reinpräparirte Material mit einer

---

[1]) Nederländische Lancet (1848—1849), S. 694.

[2]) Archiv f. physiologische Heilkunde (1852), S. 332.

[3]) Diese Lösung wurde durch Alkohol und Merkuronitrat, aber nicht durch Essigsäure, Schwefelsäure, Alaun, Bleiacetat, Eisenchlorid oder Kupfersulphat gefällt.

[4]) Als Beispiel möge erwähnt werden, dass 530 Linsenkapseln, deren Zubereitung fünftägige fleissige Arbeit in Anspruch nahm, 2,8 Gramm reines, im Exsiccator getrocknetes Material ergaben.

schwach alkalischen Flüssigkeit, z. B. 0,1 proc. Kalilauge, zu extrahiren, um die Substanz, welche dem Gewebe seine Form und physikalische Beschaffenheit gibt, zu isoliren. Die Membrane enthalten nämlich, wenn auch in geringer Menge, einen Eiweisskörper, welcher durch diese Behandlung in die Flüssigkeit übergeht und durch mehrmals wiederholte Extraction vollständig ausgelaugt werden konnte. Aus der alkalischen Lösung wurde durch vorsichtigen Zusatz von Essigsäure eine flockige Fällung ausgeschieden, die in der ersten Extractionsflüssigkeit reichlicher als in den späteren war, und alle Reactionen eines Albuminats gab. Nachdem diese Fällung abfiltrirt war, gab das Filtrat mit Gerbsäure oder einer anderen Eiweissreagenz keine weitere Fällung. Bei mehreren Gelegenheiten wurde sowohl die Fällung wie das davon erhaltene concentrirte Filtrat mit Salzsäure gekocht, aber niemals wurde danach Reaction auf eine reducirende Substanz bei der Trommer'schen Probe erhalten, weswegen das Vorhandensein einer mucinartigen Substanz ausgeschlossen sein dürfte (siehe S. 240).

Als die angewandte Extractionsflüssigkeit, die in einem Zwischenraum von 1—2 Tagen erneuert wurde, keine Spur von Fällung durch Essigsäure, Essigsäure und Ferrocyankalium oder Gerbsäure mehr zeigte, wurde das Auslaugen mit einer grossen Menge destillirten Wassers zuerst bei Zimmertemperatur, später bei 30—40° C. vorgenommen, um das Alkali vollständig zu entfernen. Weder in betreff ihrer Durchsichtigkeit, ihrer Consistenz, noch ihrer Elasticität erlitten die Membrane unter diesem Reinigungsprocess irgend eine Veränderung, sondern behielten vollständig ihr ursprüngliches Aussehen bei. Nachdem sie mit Alkohol und Aether ausgewaschen und im Exsiccator getrocknet waren, stellten sie eine aus spröden, gelblich durchsichtigen Lamellen bestehende Masse dar.

Die chemische Untersuchung, welche natürlich die Linsenkapsel und die Descemet'sche Haut, jedes für sich allein, betraf, stellte es fest, dass diese beiden Membrane von Substanzen gebildet werden, die, wenn auch nicht vollkommen identisch, doch von so übereinstimmender Natur sind, dass

sie für zwei einander sehr nahestehende Repräsentanten einer und derselben Substanzengruppe angesehen werden müssen. Jedoch lässt sich diese Substanzengruppe nicht unter die früher bekannten Proteïnsubstanzgruppen einordnen, und schlage ich, auf Grund der Art ihres Vorkommens, die Benennung «Thierisches[1]) Membranin» vor.

Es erscheint angebracht, zuerst eine Darstellung darüber zu geben, was die in der Descemet'schen Haut und der Linsenkapseln gefundenen Substanzen gemeinsam auszeichnet, und damit das Membranin von früher bekannten Substanzengruppen abzugrenzen, um später die Verschiedenheiten, die sich möglicher Weise in den Membraninsubstanzen verschiedenen Ursprungs vorfinden, in Erwägung zu ziehen.

Das Membranin ist bei gewöhnlicher Temperatur in Wasser, Salzlösungen, sowie verdünnten Säuren und Alkalien unlöslich. Bei höherer Temperatur, z. B. bei hinreichendem Kochen, löst es sich dagegen auf.

Von mehr concentrirten Mineralsäuren und Alkalien wird es schon bei Zimmertemperatur angegriffen. Pepsin und Salzsäure, sowie alkalische Trypsinlösung vermögen bei geeigneter Temperatur das Membranin in Lösung zu bringen. Nähere Angaben über die Löslichkeitsverhältnisse folgen unten.

Beim Erwärmen:

mit 25proc. Salpetersäure wird die Substanz schnell intensiv gelb gefärbt und löst sich bald zu einer gelben Flüssigkeit, welche, mit Ammoniak übersättigt, eine dunkle Orangefarbe annimmt;

mit Millon's Reagens nimmt das Membranin eine ganz besonders prächtige, dunkelrothe Farbe an, die intensiver als bei jeder anderen mir bekannten Proteïnsubstanz ist, und wodurch die klare Durchsichtigkeit der Substanz nicht verloren geht. Die Flüssigkeit bleibt ungefärbt;

mit concentrirter Salzsäure zeigt sich keine nennenswerthe Färbung. Im ersten Augenblick kann das Membranin

---

[1]) Salkowski hat nämlich mit dem Namen «Membranin» die Cellulosemembran der Hefezellen bezeichnet. Du Bois-Reymond's Archiv, physiologische Abtheilung, 1890, S. 554.

eine Andeutung von violettem Schimmer zeigen, löst sich jedoch bald zu einer schwach gelbbraunen Flüssigkeit;

mit Adamciewic's Reagens färbt sich die Substanz, wenn das Erwärmen mit Vorsicht vorgenommen wird, rothbraun, und die Flüssigkeit nimmt eine sehr schwache, unrein violettrothe Farbe an, die beim Aufkochen augenblicklich in gelbbraun-schwarzbraun übergeht. Lässt man dieselbe Reagens in Zimmertemperatur einwirken, so ist nach einem Tage das Membranin nur wenig gelb, nach 2 Tagen schwach violettbraun gefärbt;

mit 10proc. Kalilauge tritt rasche Lösung ein; die Flüssigkeit färbt sich bei Zusatz von Bleiacetat dunkelbraun; nach erfolgter Abkühlung, unter allmälig gesteigertem Zusatz von verdünnter Kupfersulphatlösung — rosa, violett, — violettblau;

mit 5proc. Salzsäure im Wasserbade wurde eine schwach gelbbraune Flüssigkeit erhalten, die bei der Trommer'schen Probe kräftig reducirte. Ebenso sicher und viel rascher erhält man die reducirende Substanz, wenn man in einer Probenröhre über einer kleinen Flamme das Membranin mit einigen Tropfen 25proc. Salzsäure erwärmt, bis die Mischung nach 1—2 Minuten dunkel wird und die Flüssigkeit bis auf wenige Tropfen verdunstet ist.

Die durch Erhitzen der Substanz mit dest. Wasser bei 100—130° C. entstandene Lösung gelatinirt nicht, selbst nicht bei starker Concentration. Beim Prüfen mit Reagenzien zeigt sie keine grössere Fällbarkeit, wird z. B. durch Essigsäure, Salzsäure, Ferrocyankalium und Salzsäure, Salpetersäure (gibt bei der Heller'schen Probe keinen Ring), Quecksilberchlorid, Bleiacetat, Silbernitrat, Kupfersulphat, Eisenchlorid oder Alaun nicht gefällt, wohl aber von Merkuronitrat, Quecksilberjodid-Jodkalium und Salzsäure, Phosphormolybdensäure, Gerbsäure und Alkohol reichlich gefällt.

Wird das Membranin durch Kochen mit verdünnter Säure oder Alkali gelöst, so bieten die erhaltenen Lösungen ungefähr dieselben Fällbarkeitsverhältnisse dar. Besonders verdient hervorgehoben zu werden, dass weder bei dem einen

noch dem anderen Verfahren ein durch verdünnte Säure oder Säure und Ferrocyankalium fällbares Product (Mucinsubstanz, Albuminat) auftritt.

Da das Material so beschwerlich zu beschaffen war, ist die Vollständigkeit der quantitativen Analysen nicht so gross geworden, wie zu wünschen wäre.

Präp. No. I. Linsenkapselmembranin. Zur Extraction angewandte Flüssigkeit: 0,2 proc. Kalilauge.
0,114 gr. = 14,00 % Stickstoff.

Präp. No. II. Wie das Vorherg. 0,2 proc. Kalilauge.
0,102 gr. = 14,19 % Stickstoff.

Präp. No. III. Wie das Vorherg. 0,1 proc. Kalilauge.
0,243 gr. = 14,11 % Stickstoff,
1,043 gr. = 0,83 % Schwefel.

Mittelwerth: 14,10 % Stickstoff, 0,83 % Schwefel.

Präp. No. I. Membranin aus der Descemet'schen Haut, Extractionsflüssigkeit: 0,1 proc. Kalilauge.
0,165 gr. = 14,70 % Stickstoff.

Präp. No. II. Wie das Vorherg. 0,2 proc. Kalilauge.
0,195 gr. }
0,1545 gr. } = 14,86 % Stickstoff.

Präp. No. III. Wie das Vorherg. 0,2 proc. Kalilauge.
0,171 gr. = 14,74 % Stickstoff.
0,753 gr. = 0,90 % Schwefel.

Mittelwerth: 14,77 % Stickstoff, 0,90 % Schwefel.

Wenn man die physikalische Beschaffenheit des Membranin, seinen relativ niedrigen Schwefelgehalt und seine Eigenschaft, beim Kochen mit Mineralsäure eine reducirende Substanz zu geben, in Betracht zieht, liegt die Annahme nahe bei der Hand, dass die Membrane eine mechanische Mischung einer Mucinsubstanz mit einem schwerlöslichen, stickstoffreichen Proteïnstoffe, wie z. B. Collagen, Elastin, ausmachen, wie es sich oben bei den Grundsubstanzen des Knorpels und der Hornhaut herausgestellt hat. Meine erste Vermuthung ging auch ganz natürlich in dieser Richtung, weswegen es mich überraschen musste, dass es mir beim ersten Versuche, diese Vermuthung zu controlliren, nicht gelang, auch nur eine Spur einer mucinartigen Substanz, weder in der Linsenkapsel noch

in den Descemet'schen Membranen, nachzuweisen. Seitdem haben wiederholte Versuche dasselbe bestimmte Resultat ergeben und, da sie für meine Auffassung der Natur des Membranin von fundamentaler Bedeutung sind, will ich hier die wichtigsten anführen. In verschiedenen Partien wurden Linsenkapsel und Descemet'sche Haut der Extraction mit alkalischen Flüssigkeiten nach folgender Anordnung unterworfen, wobei die Flüssigkeit täglich gewechselt wurde:

Linsenkapsel:

0,25 procentiges Natriumcarbonat,	2	Tage	(40° C.),
0,1 procentige Kalilauge	3	»	Zimmerwärme,
0,2 procentige »	5	»	»
0,2 procentige »	7	»	»
0,5 procentige »	3	»	»
2,0 procentiges Ammoniak . . .	3	»	»

Descemet'sche Haut:

0,25 procentiges Natriumcarbonat,	2	Tage	(40° C.),
0,1 procentige Kalilauge	7	»	Zimmerwärme,
0,2 procentige »	8	»	»
0,2 procentige » . . .	10	»	»
0,2 procentige » . . .	12	»	»
0,5 procentige »	6	»	»
1,0 procentige »	1	Tag	»
1,0 procentige »	3	Tage	»

Bei allen diesen Versuchen wurden einerseits die Membranreste, andererseits die Extractionsflüssigkeit (nach Concentrirung) durch Kochen mit Salzsäure und die Trommer'sche Probe[1]) geprüft. Als übereinstimmendes Resultat ging daraus hervor:

1. dass in den Extractionsflüssigkeiten keine Reaction auf reducirende Substanzen erhalten wurde;
2. dass die Membranreste dagegen bedeutende Reduction hervorbringen;

---

[1]) Nachdem die Membranreste ausgewaschen waren, wurden sie auch mit Millon's Reagens geprüft; in allen Proben war die Reaction in demselben auffallenden Grade intensiv wie beim Versuch mit den ursprünglichen Membranen.

3. dass die Reaction bei Trommer's Probe nicht bemerklich schwächer war als bei Anwendung einer gleichen Menge der ursprünglichen Membrane.

Hiernach war es nicht mehr möglich, an das Vorhandensein einer Mucinart, als Quelle für die reducirende Substanz, zu denken, ebenso wenig konnte es sich um eine Art Glycoproteïd, Kohlenhydrat, Chondroïtsäure oder einen ähnlichen leicht löslichen Stoff handeln, vielmehr muss der reducirende Atomcomplex in der in Alkalien unlöslichen Membransubstanz, dem Membranin, enthalten sein, welches letztere gerade dadurch seine, von den anderen in den höheren Thierklassen[1]) vorkommenden Proteïngruppen getrennte Stellung einnimmt.

Wenn man, ohne Rücksicht auf diese charakteristische Eigenschaft zu nehmen, einen Vergleich zwischen dem Membranin und anderen Proteïnstoffen anstellt, so wird man finden, dass es sich in anderer Beziehung am meisten dem Elastin und Collagen nähert, ohne doch vollständig mit einem derselben übereinzustimmen. Die physikalische Beschaffenheit und die Löslichkeitsverhältnisse sind im Ganzen betrachtet recht ähnlich: beim Kochen mit Wasser, Säuren oder Alkalien bilden diese Substanzen leicht lösliche Producte, die sich durch eine geringe Fällbarkeit auszeichnen, während dabei Albuminate nicht gebildet werden; weiter sind sie alle drei an Schwefel arm. Das Membranin weicht jedoch von den beiden anderen ab, unter Anderem dadurch, dass es bleischwärzenden Schwefel enthält, und im Besonderen vom Collagen durch ausserordentlich schöne Millon'sche und Xantoproteïnsäure-Reaction, und durch sein Unvermögen, im aufgelösten Zustande zu gelatiniren. Von den übrigen Proteïnsubstanzgruppen unterscheidet sich das Membranin so wesentlich, dass mir eine detaillirte Auseinandersetzung überflüssig erscheint.

---

[1]) Bei niedriger stehenden Thieren sind, wie bekannt, in Wasser, Alkalien und Säuren unlösliche Substanzen, z. B. Chitin bei den Gliederthieren, Hyalin in den Wänden der Echinococcusblase anzutreffen, welche beim Kochen mit Säure reducirende Producte ergeben, aber sich im Uebrigen bedeutend vom Membranin unterscheiden; so unter Anderem durch sehr niedrigen Stickstoffgehalt (4,5 %—6,0 %) und gänzlichen Mangel an Schwefel.

Obgleich die selbständige Stellung des in der Linsenkapsel und der Descemet'schen Haut gefundenen Membranins unter den Proteïnsubstanzgruppen also zweifellos festgestellt ist, so ist man doch nicht berechtigt, das Membranin der Linsenkapsel mit dem aus der Descemet'schen Haut für identisch zu halten. Es herrscht zwischen beiden nämlich ein nicht geringer Unterschied in Betreff der Widerstandskraft gegen chemische Agentien, oder mit anderen Worten der Löslichkeitsverhältnisse, wie zahlreiche, parallel angestellte Versuche deutlich zeigen[1]).

1. Verhältniss zu Säuren bei gewöhnlicher Temperatur.

	Linsenkapsel.	Descemet'sche Haut.
25 proc. Salzsäure.	Nach 4 St. — vollständig gelöst.	Nach 1 St. — nicht bemerkbar beeinflusst.
	—	5 St. — bedeutend aufgeweicht und zerfallen.
	—	7 St. — vollständig gelöst.
25 proc. Salpetersäure.	Nach 4 St. — vollständig gelöst.	Nach 4 St. — ein wenig erweicht.
	—	Nach 5 Tagen — nicht bemerkbar gelöst,
Concentr. Salzsäure.	Nach 45 Min. — vollständig gelöst.	Nach 25 Min. — nicht bemerkbar beeinflusst.
	—	5 St. — aufgeweicht.
	—	7 St. — vollst. gelöst.
Concentr. Schwefelsäure.	Nach 4 St. — nicht bemerkbar beeinflusst.	—
	15 St. — im Zerfallen begriffen.	—
	20 St. — vollständig gelöst.	20 St. — unverändert.
	—	2 Tg. — erweicht und in kleinere Theile zerfallen.
	—	5 Tg. — noch nicht vollständig gelöst.

[1]) Beim Versuche mit Säuren, Alkalien und Fermenten werden die respect. Membranen in ihrer ursprünglichen Gestalt verwendet; beim Kochen mit Wasser sowohl die ursprünglichen Membrane wie auch Präparate von reinem Membranin.

2. Verhältniss zu Alkalien bei gewöhnlicher Temperatur.

	Linsenkapsel.	Descemet'sche Haut.
20proc. Kalilauge	Nach 5 Min. — gelöst.	5 Min. — nicht verändert.
	—	45 Min. — erweicht.
	—	1,45 St. — gelöst.
10proc. »	Nach 20 Min. — gelöst.	20 Min. — unverändert.
	—	4 St. — erweicht.
	—	1 Tg. — zum Theil gelöst.
	—	1 T.g. 3 St. — vollst. gelöst.
5proc. »	Nach 1 Stunde — gelöst.	1 St. — unverändert.
	—	5 Tg. — noch unverändert.
3proc. »	Nach 1,30 St. — gelöst.	—
1proc. »	Nach 3 Tg. — bedeutend erweicht.	—
	5 Tg. — gelöst.	—
0,5proc. » 0,1proc. »	Nach 5 Tagen — keine bemerkbare Einwirkung.	—
Gesättigte Barytlösung.	Nach 2 Tg. — gelöst.	2 St. — unverändert. 5 Tg. — keine bemerkbare Einwirkung.

3. Verhältniss zu Alkalien beim Kochen.

	Linsenkapsel.	Descemet'sche Haut.
20proc. Kalilauge	Beinahe augenblicklich gelöst.	Nach $^1/_4$ Min. — gelöst.
10proc. »	Wie oben.	» $^3/_4$ » — »
5proc. »	Wie oben.	» $1^3/_4$ » — »
3proc. »	Wie oben.	» $3^3/_4$ » — »
1proc. »	In $^1/_4$ Min. gelöst.	—
0,5proc. »	Wie oben.	—
0,1proc. »	Nach $^1/_2$ Min. — zerfliessen in faserigen Schleim.	—
	Nach 1 Min. — vollständig gelöst.	—
	—	Nach 2,30 St.[1]) — noch nicht vollständig gelöst.

[1]) Das Kochen wurde in einem Kolben mit Rückflusskühler ausgeführt.

4. Verhältniss zu Pepsin und Trypsin.

Ein und dieselbe Enzymlösung wurde beim Prüfen beider Membrane angewandt. Digestionstemperatur: 40° C.

	Linsenkapsel.	Descemet'sche Haut.
Pepsin mit 0,2proc. Salzsäure.	Nach 1,45 St. — vollständig gelöst.	Nach 2 Tg. — nicht bemerkbar beeinflusst.
Pankreasglycerin-extract mit 0,25-procentigem Natriumcarbonat.	Nach 1,15 St. — beinahe Alles gelöst.	Nach 2 Tagen — nicht bemerkbar beeinflusst.
	1,45 St. — vollständ. gelöst.	—
Pankreasglycerin-Extract mit dest. Wasser.	Nach 6 St. — bedeutend erweicht.	Nach 2 Tg. — nicht bemerkbar beeinflusst.
	9 St. — vollständig gelöst.	—

Aus diesen Digestionsversuchen ging der Unterschied in der Löslichkeit besonders deutlich hervor, indem dieselbe Digestionsflüssigkeit, die in einer oder mehreren Stunden die Linsenkapsel auflöste, während 2 Tagen die Descemet'sche Haut nicht in wahrnehmbarer Weise angreifen konnte, was geradezu die Vorstellung erwecken könnte, dass die letztere überhaupt in künstlichen Verdauungsflüssigkeiten nicht löslich sei. Dass dies jedoch nicht der Fall ist, zeigte ein Versuch mit enzymreicheren und durch erhöhten Zusatz von Säuren resp. Alkali kräftiger wirkenden Digestionsflüssigkeiten. So z. B. wurde die Descemet'sche Haut durch 0,4proc. Pepsin-Salzsäure im Laufe zweier Tage aufgelöst; ebenso in derselben Zeit durch eine mit 0,5 % Natriumcarbonat versetzte, trypsinreiche Flüssigkeit, wobei durch Controllprobe mit 0,4proc. Salzsäure resp. 0,5proc. Sodalösung festgestellt wurde, dass diese Flüssigkeiten einzeln während derselben Zeit eine lösende Wirkung nicht ausübten.

5. Verhalten beim Kochen mit Wasser.

Durch Kochen mit dest. Wasser in einem Glaskolben, wobei die Flüssigkeit durch einen angefügten Rückflusskühler am Verdunsten verhindert wurde, löste sich die Linsenkapsel in wenigen Stunden (bei verschiedenen Versuchen in 6, $6^1/_2$,

7, $8^1/_2$ Stunden) vollständig in eine klare Flüssigkeit auf. Bei einer gleichen Behandlung der Descemet'schen Haut konnte keine Lösung der Substanz beobachtet werden, nicht einmal nach 24 Stunden fortgesetztem Kochen. Erst beim Ueberhitzen mit Wasser wurde die Descemet'sche Haut angegriffen. Bei einem solchen Versuche, wobei die Temperatur auf 130—135° C. gehalten wurde, löste sie sich vollständig nach $5^1/_2$ Stunden, nachdem sie schon nach 3 Stunden in weiche Fetzen zerfallen war. Was die Löslichkeit der Linsenkapsel in kochendem Wasser anbelangt, muss ich also auf Grund wiederholter Versuche Strahl in seiner Controverse mit Mensonides (s. S. 233) unbedingt Recht geben.

In seinem Verhalten zu allen hier angeführten chemischen Agentien zeichnet sich also das Membranin der Descemet'schen Haut durch eine weit bedeutendere Widerstandskraft, oder Schwerlöslichkeit, vor dem aus der Linsenkapsel aus. Auch die Zusammensetzung weist eine constante Abweichung auf, indem der Stickstoffgehalt im Membranin der Descemet'schen Haut um 0,6 % höher ist. Ungeachtet dass die in der Hauptsache herrschende Uebereinstimmung die Substanzen in der Linsenkapsel und der Descemet'schen Haut in einer Gruppe, dem Membranin, zusammenführt, so dürften doch auf Grund des Vorhergehenden genügende Ursachen vorliegen, jedes für sich als ein chemisches Individuum anzusehen.

Die Membraninsubstanzen scheinen mir am ehesten eine Mittelstellung zwischen den Mucinarten und dem Elastin einzunehmen, wobei das Linsenkapselmembranin durch seine grössere Löslichkeit und den geringeren Stickstoffgehalt sich mehr der ersteren Gruppe nähert, das Membranin der Descemet'schen Haut durch entgegengesetztes Verhalten sich mehr dem Elastin anschliesst.

Der Glaskörper.

Der geleeartige Glaskörper (corpus vitreum) besteht aus einer klaren Flüssigkeit (Glasflüssigkeit), welche in ein Fachgerüst subtiler Häutchen eingeschlossen ist. Eine chemische

Untersuchung des Glaskörpers muss natürlich auf diese Eintheilung Rücksicht nehmen, so dass die Glasflüssigkeit und die Membrane von einander getrennt und jedes für sich behandelt werden.

1. Die Glasflüssigkeit.

In reichlicher Menge und mit geringer Beschwer gewinnt man diese Flüssigkeit, wenn man den Glaskörper mit der Scheere zerschneidet oder durch ein Sieb treibt und dann auf den Filter bringt. Das Filtriren geht rasch vor sich und man erhält die Glasflüssigkeit als dünnflüssiges, nicht fadenziehendes, wasserklares Filtrat. Aus den recht zahlreichen Untersuchungen der quantitativen Zusammensetzung der Glasflüssigkeit geht übereinstimmend hervor, dass die Menge an Proteïnsubstanzen besonders gering ist. So nennen:

Berzelius[1]) (1830): 0,16 % «Eiweiss».
Frerichs[2]) (1848): 0,12 % «Natronalbuminat».
Lohmeier[3]) (1854): 0,14 % «Natronalbuminat»[4]).
Dogiel[5]) (1879: «nur eine Spur von Eiweiss».
Deutschmann[6]) (1879): 0,11 % «Eiweiss».
Portes[7]) (1880): 0,19 % «matières albuminoïdes».

---

[1]) Lärobok i kemien (1830), Bd. 6, S. 510.

[2]) Hannover'sche Annalen (1848), S. 657.

[3]) Beiträge zur Histologie und Aetiologie der erworbenen Linsenstaare. Zeitschrift f. rationelle Medicin (Henle u. Pfeufers). Neue Folge Bd. 5, S. 56 (1854.)

[4]) In Wirklichkeit fand Lohmeier nur 0,05 % Eiweissstoff und erhielt den bedeutend höheren Werth 0,14 % durch Summiren der Eiweissmenge mit der in der Asche gefundenen Menge »Natron», welches Verfahren nach unseren jetzigen Begriffen nicht für statthaft angesehen werden kann.

[5]) Zur Kenntniss der Eiweissreactionen und von dem Verhalten des Albumins der lichtbrechenden Medien des Auges. Archiv f. die gesammte Physiologie (Pflüger's), Bd. 19, S. 335 (1879).

[6]) Fortgesetzte Untersuchungen zur Pathogenese der Cataract. Archiv f. Ophtalmologie (v. Gräfe's). Bd. 25, del. 2, S. 211 (1879).

[7]) Etude du corps vitré. Journal de l'anatomie et de la physiologie. Bd. 16, S. 233 (1880). In dieser histologischen Abhandlung ist das Resultat von Porte's chemischen Untersuchungen des Glaskörpers enthalten.

Cahn[1]) (1881): 0,07 % «Eiweiss».
Giacosa[2]) (1882): 0,12 % «Albuminstoffe».

Ueber die Art der gefundenen Proteïnsubstanzen geben die drei zuletzt genannten Verfasser nähere Auskunft und dürfte durch sie das Vorhandensein von wirklichen Eiweissstoffen in der Glasflüssigkeit unzweifelhaft festgestellt sein. Sämmtliche haben sie nämlich zwei verschiedene Eiweisskörper, eine Globulin- und eine Albumin-Substanz, nachweisen können. Die erstere wurde von Cahn für identisch mit Serumglobulin gehalten und ihre Menge von demselben auf 0,05 %, von Portes auf 0,09 % bestimmt; das Albumin, das von Cahn und Giacosa für Serumalbumin gehalten wird, machte nach Portes' und Cahn's übereinstimmenden Beobachtungn 0,03 % aus.

Da die Eiweisskörper der Glasflüssigkeit in so äusserst geringer Menge vorkommen und in ihrer Art nichts besonders Interessantes zu bieten scheinen, habe ich mich nicht auf weitere Untersuchungen derselben eingelassen.

Eine andere Frage schien mir dagegen mehr Aufmerksamkeit zu verdienen, nämlich die, in wie weit eine Mucinsubstanz in der Glasflüssigkeit enthalten ist, da nämlich die Angaben hierüber, ungeachtet der nicht selten erneuerten Versuche, dafür und dawider sprechen, dass es unmöglich ist, sich aus ihnen eine bestimmte Auffassung über das wirklich Richtige zu bilden.

Nach ihrer Zeitfolge aufgezählt haben die Forscher, die bisher Untersuchungen hierüber angestellt haben, die Frage über das Vorkommen von Mucin in der Glasflüssigkeit[3]) auf folgende Weise beantwortet:

Berzelius[4]) . . . . . [5])
Frerichs[6]) . . . . . . [5])

---

[1]) Zur physiologischen und pathologischen Chemie des Auges. Zeitschrift f. physiologische Chemie, Bd. 5, S. 213 (1881).

[2]) Sugli albuminoidi del vitreo dell'occhio umano. Goinarale della R. accademia di Medicina .di Torino. Bd. 45, S. 71 (1882).

[3]) Alle diese Angaben beziehen sich auf ein und dasselbe Untersuchungsmaterial, die Glasflüssigkeit vom Rindvieh.

[4]) Loc. cit.

[5]) Die Mucinfrage wird nicht berührt.

[6]) Loc. cit.

Virchow[1] . . . . bejahend,
Lohmeier[2] . . . . . verneinend,
Ciaccio[3] . . . . . . »
Schwalbe[4] . . . . . »
Dogiel[5] . . . . [6]),
Deutschmann[7] . . . verneinend,
Portes[8] . . . . bejahend,
Cahn[9] . . . . verneinend,
Giacosa[10] . . . . . . bejahend.

Die nächste Veranlassung dazu, dass die vorhandenen Angaben, ungeachtet ihrer Zahl, nicht im Stande sind, auf überzeugende Weise das Vorhandensein von Mucin zu beweisen oder absolut auszuschliessen, liegt darin, dass gerade solche Angaben, die in erster Stelle zur Aufklärung der Frage angeführt werden sollten, bei Seite gelassen worden sind. So fehlen Angaben über die Möglichkeit, aus den Proteïnsubstanzen der Glasflüssigkeit durch Kochen mit Mineralsäure eine reducirende Substanz herzustellen, sowie über die elementare Zusammensetzung der Substanz, die man aus anderen Gründen für Mucin hält.

Ueber diese für die richtige Beurtheilung der Sache fundamentalen Verhältnisse findet sich in keiner der Arbeiten, welche das Mucin als einen Bestandtheil der Glasflüssigkeit aufnehmen, eine bestimmte Angabe. Um sich für das Vorhandensein von Mucin zu entscheiden, hat man sich im Allgemeinen damit begnügt, eine in Ueberschuss von Essigsäure

---

[1]) Archiv f. pathologische Anatomie, Bd. 4, S. 468.

[2]) Loc. cit.

[3]) Beobachtungen über den inneren Bau des Glaskörpers im Auge des Menschen und der Wirbelthiere im Allgemeinen. Untersuchung zur Naturlehre des Menschen und der Thiere (Moleschott's), Bd. 10, S. 583 (1870).

[4]) Untersuchung des Glaskörpers, erwähnt im Handbuch der gesammten Augenheilkunde von Gräfe und Sämisch, Bd. 1, S. 46 (1874).

[5]) Loc. cit.

[6]) Die Mucinfrage wird nicht berührt.

[7]) Loc. cit.

[8]) Loc. cit.

[9]) Loc. cit.

[10]) Loc. cit.

mehr oder weniger schwer lösliche Substanz nachzuweisen (Virchow, Portes, Giacosa), was zur Folge hatte, dass eine Untersuchung auf die andere folgte, ohne dass eine merkbar grössere Klarheit gewonnen wurde. Ebenso ist es sicher, dass die Forscher, die das Vorkommen von Mucin verneint haben, ihr Urtheil darauf gründeten, dass es ihnen nicht gelang, beim Prüfen der Glasflüssigkeit mit Essigsäure eine Fällung, oder doch wenigstens eine solche mit der bei Mucin gewohnten Unlöslichkeit durch Ueberschuss von Essigsäure, zu erhalten.

Aber wenn nun das Dasein einer Mucinsubstanz in der Glasflüssigkeit sich auf eine vollkommen exacte und unanfechtbare Weise beweisen lässt, wie wir unten erfahren werden, wie soll man es dann erklären, dass die Frage in einigen Untersuchungen (Berzelius, Frerichs, Dogiel) übersehen worden und bei noch zahlreicheren (Lohmeier, Ciaccio, Schwalbe, Deutschmann und Cahn) mit Bestimmtheit verneint worden ist?

Ueber die Ursache kann ich nicht länger im Zweifel sein, seit ich durch wiederholte Versuche zur Einsicht gekommen bin, dass die im Verhältniss zur Mucinsubstanz relativ grosse Salzmenge, vorzüglich Chlornatrium, welche die Glasflüssigkeit enthält, das Ausfällen der Mucinsubstanz bedeutend hindern, indem sie zugleich die Schwerlöslichkeit einer etwa entstandenen Fällung in Ueberschuss an Säure vermindern können.

Eine deutliche Fällung wurde also nicht erhalten, weder sogleich noch nach Verlauf einiger Stunden, sondern nur eine Opalescenz von bei verschiedenen Gelegenheiten ungleicher Stärke, wenn die natürliche Glasflüssigkeit mit Essigsäure in kleineren oder grösseren Mengen versetzt wurde. Wurde dagegen der Salzgehalt durch Verdünnen der Glasflüssigkeit mit dest. Wasser vermindert, so konnte die Substanz, wenn auch mitunter langsam, ziemlich vollständig mit Essigsäure ausgefällt werden. Dieselbe Veränderung im Verhalten zu Essigsäure entstand durch Dialysiren der Glasflüssigkeit.

Für Herstellung der Substanz in grösseren Mengen eignete sich aus practischen Gründen nur die erstere Art; von diesen

Versuchen mögen hier einzelne angeführt werden. Keine der angewandten Glasflüssigkeitspartien konnte direct durch Essigsäure gefällt werden:

1. 150 cbcm. Glasflüssigkeit wurden zu 1,000 cbcm. verdünnt (1 + 6); beim Zusatz von Essigsäure zu 0,75 % entstand sogleich eine flockige Fällung, die sich während der Nacht auf den Boden des Gefässes setzte.
2. 800 cbcm. Glasflüssigkeit wurden zu 2,400 cbcm. verdünnt (1 + 2); beim Zusatz von Essigsäure zu 1 % trat unmittelbar Fällung ein.
3. 1,500 cbcm. Glasflüssigkeit wurden zu 3000 cbcm. zerdünnt (1 + 1); bei Zusatz von Essigsäure zu 1 % = unmittelbar starke Opalescenz, aber keine Fällung.

   Die Mischung wurde in 2 Partien à 1,500 cbcm. getheilt:

   a) 1,500 cbcm. wurden zu 3000 cbcm. verdünnt (1 + 3); Essigsäuregehalt 0,5 %, unmittelbar: sehr starke Opalescenz. Nach einer Stunde: feinflockige Fällung.

   b) 1,500 cbcm. wurden zu 3000 cbcm. verdünnte (1 + 3); Zusatz von Essigsäure zu 1,5 %. Sofort trat Fällung ein.
4. 700 cbcm. Glasflüssigkeit, zu 2,100 cbcm. verdünnt (1 + 2); Zusatz von Essigsäure zu 0,5 %. Unmittelbar: starke Opalescenz. Nach einer Stunde: feinflockige Fällung, die sich am folgenden Morgen auf den Boden gesetzt hatte.

Es zeigte sich also, dass das schnellere oder langsamere Eintreten der Fällung theils von dem Grad der Verdünnung, theils vom Gehalt an Essigsäure abhing. Zugleich ging daraus hervor, dass man mit Sicherheit darauf rechnen kann, die Substanz auszufällen, wenn man die Glasflüssigkeit mit 2—3 Volumen dest. Wasser verdünnt und den Essigsäurezusatz so gross nimmt, dass die Mischung ungefähr 1 % davon enthält. Nach Verlauf von 1—2 Tagen wurde die noch immer trübe, überstehende Flüssigkeit von der Fällung abdecantirt; letztere bildete eine im Boden des Gefässes festklebende, grauweisse Masse. Die Substanz wurde durch Lösen in schwachem Alkali und Ausfällen mit Essigsäure, was 1—2 Mal wiederholt wurde, gereinigt.

Eine mit einer minimalen Alkalimenge bereitete, neutral reagirende Lösung verrieth dieselben physikalischen Eigenschaften und qualitativen Reactionen, wie eine Lösung von Corneamukoïd, weswegen es genügt, auf das, was wir in

dieser Hinsicht über Corneamukoïd erfahren haben (Abtheil. II), hinzuweisen. Wenn eine Reaction hier vor den anderen betont zu werden verdient, so ist es das Verhalten der Substanz zu Trommer's Probe nach erfolgtem Kochen mit einer verdünnten Mineralsäure; dabei wurde Reaction auf ein reducirendes Product erhalten. Stickstoff- und Schwefelbestimmungen wurden an zwei Präparaten vorgenommen:

No. I.	0,105 gr. =	12,20 %	Stickstoff,
	0,716 gr. =	1,19 %	Schwefel.
No. II.	0,157 gr. / 0,173 gr. =	12,25 %	Stickstoff.
	1,1415 gr. =	1,20 %	Schwefel.
	Mittelwerth:	12,27 %	Stickstoff.
		1,19 %	Schwefel.

Sowohl die qualitativen Reactionen wie der niedrige Stickstoffgehalt zeigen deutlich und klar, dass die mit Essigsäure aus der Glasflüssigkeit gefällte Substanz eine Mucin- oder, näher bestimmt, eine Mukoïd-Substanz ist.

Erst durch Anführung dieser Facta ist die so oft aufgeworfene und so verschieden beantwortete Frage über das Vorkommen einer Mucinsubstanz in der Glasflüssigkeit auf eine Weise beantwortet, die keinen Zweifel mehr aufkommen lässt.

Zum Unterschiede von anderen Mukoïdsubstanzen und um zugleich seinen Ursprung anzugeben, kann das Mukoïd der Glasflüssigkeit am passendsten Hyalomukoïd[1]) genannt werden.

---

[1]) Mit der Benennung «Hyalomucine» glaubte Portes[1]) die Mucinsubstanz der Glasflüssigkeit bezeichnen zu müssen, weil: «elle ne se comporte pas exactement comme la vraie mucine. Elle se dissout, ou plutôt parait se dissoudre, dans l'acide acétique, si, d'emblée, on verse dans le tube à expérience un grand excès d'acide, puis au bout de quelques heures se précipite. Si au contraire, on verse l'acide goutte à goutte, il n'y a pas apparence de dissolution». In diesem von Portes bemerkten Verhalten darf man jedoch mit keinem Recht etwas für die Mucinsubstanz der Glasflüssigkeit Characteristisches sehen, sondern dürfte sowohl für die Mucinsubstanzen im Allgemeinen gelten. Wenigstens habe ich noch keine Mucinsubstanz in Prüfung gehabt, die sich bei raschem Zusatz einer grösseren Menge Essigsäure nicht gelöst hätte.

---

[1]) Loc. cit.

Mit keiner der übrigen durch Untersuchungen näher bekannten mukoïden Substanzen (Chondromukoïd, Pseudomucin, Ascitesmukoïd, Corneamukoïd) zeigt das Hyalomukoïd eine so grosse Uebereinstimmung, dass man an Identität denken könnte. Besonders unterscheidet es sich von seinem einzigen Verwandten in den lichtbrechenden Medien, dem Corneamukoïd, durch einen weit niedrigeren Schwefelgehalt (1,19 % gegen 2,07 %).

Eine umfassende Untersuchung der Zersetzungsproducte des Hyalomukoïds ist von mir nicht vorgenommen worden. So viel wurde jedoch festgestellt, dass dieses Mukoïd beim Einwirken von Alkalien oder Säuren kein Product gibt, das beim Neutralisiren der Reactionsflüssigkeit, beim Zusatz von Mineralsäure oder einer verdünnten Säure mit Ferrocyankalium fällbar wäre; dasselbe war bei entsprechender Behandlung von Corneamukoïd der Fall.

Die Menge des Hyalomukoïds in der Glasflüssigkeit ist sehr unbedeutend; Portes[1]) berechnete sie auf 0,07 %, und ungefähr die gleiche Menge erhielt ich beim Herstellen von Mukoïd, indem 1 Liter Glasflüssigkeit 0,5 gr. zu geben pflegte. Man kann daher mit Sicherheit annehmen, dass seine Menge in der Glasflüssigkeit 0,1 % nicht übersteigt. Legt man hierzu ungefähr 0,1 % Eiweiss, so erhält man als ungefähren Ausdruck für den Total-Proteïngehalt der Glasflüssigkeit 0,2 %, woraus hervorgeht, dass diese Flüssigkeit die an Proteïnstoff ärmste von allen normalen Gewebeflüssigkeiten des Körpers ist, ausgenommen das Kammerwasser, welches in dieser Hinsicht ziemlich nahe mit der Glasflüssigkeit übereinstimmt.

2. Die Häute des Glaskörpers.

Die Untersuchungen, welche von Seiten der Histologen der Structur des Glaskörpers gewidmet worden, sind so zahlreich, dass es schwierig ist, sich darüber eine Uebersicht zu verschaffen. Abwechselnd sieht man in der Litteratur Untersuchungen erscheinen, die bald mit Bestimmtheit über das

Vorkommen feiner Häute im Innern des Glaskörpers genaue Auskunft geben, bald ebenso bestimmt das Vorhandensein derselben bestreiten[1]), und obgleich der Streit ungefähr 50 Jahre gewährt hat, so dürfte darüber, in wie weit es möglich ist, unter Anwendung «einwandfreier» Hilfsmittel auf mikroskopischem Wege ein Häutesystem im Glaskörper nachzuweisen, unter den Histologen noch nicht allgemeine Einigkeit herrschen. Nichtsdestoweniger können wir diese Ungewissheit unberücksichtigt lassen, da es uns auf einem anderen und noch dazu sehr einfachen Wege möglich ist, eine bestimmte Antwort auf die Frage zu erhalten.

Einen indirecten Beweis für die Existenz dieses membranösen Netzwerks muss man schon im Verhalten der Glasflüssigkeit beim Punktiren oder Zerschneiden des Glaskörpers sehn. Wenn nicht Häute vorhanden wären, so würde die an und für sich dünnflüssige Glasflüssigkeit sogleich ausrinnen, was lange nicht der Fall ist. Mehr positiv kann man die Häute nachweisen, indem man einen Theil des Glaskörpers, einerlei aus welchem Theil seines Inneren, eine Zeit lang auf einer Unterlage Filtrirpapier liegen lässt. Allmälig sickert die Glasflüssigkeit durch und hinterlässt auf dem Papier einen kaum sichtbaren, spinnwebefeinen Anflug, der mit der Pincette abgehoben werden kann und sich beim Flottiren in Wasser als aus äusserst feinen, structurlosen Häuten bestehend erweist. Wenn ganze Glaskörper in Stücke zerschnitten auf einen Filter gebracht werden, erhält man, nachdem die Glasflüssigkeit vollständig durchgeflossen ist, auf der Innenseite des Filters einen hautartigen Belag, der von allen Häuten des Glaskörpers, sowohl den äusseren, Membrana hyaloïdea, wie den inneren gebildet wird. Die Menge der also erhaltenen Häute (getrocknet) wurde von Lohmeier auf 0,02 %, von Cahn auf 0,03 % des ganzen Glaskörpers bestimmt. Ueber das chemische Verhalten dieser Häute gibt Cahn an: Nach Erhitzung mit Wasser lösten sich die Häute zu einer gelbbraunen, nicht

[1]) Das Vorhandensein einer äusseren Begrenzungsmembran, Membrana hyaloïdea, ist dagegen immer mit Leichtigkeit wahrgenommen worden.

gelatinirenden Flüssigkeit, die durch Gerbsäure reichlich gefällt wurde und beim Erwärmen mit Kalilauge und Kupfersulfat eine rothe Farbe annahm.

Die Versuche waren indessen gar zu wenig ausführlich, um eine Schlussfolgerung über die Art der Häutesubstanz zu gestatten und eine erneuerte Prüfung erschien also wünschenswerth.

Durch Filtriren von 2 L. rein präparirter und zerschnittener Glaskörper wurde ein verhältnissmässig reichliches Material zur Untersuchung beschafft. Nachdem alle Flüssigkeit hindurchgelaufen war, wurden die angewandten Filter unter Wasser geknetet, wodurch sich die feinen Häutchen allmälig zu einer fadenziehenden, elastisch zähen, gräulichen Masse zusammenbackten, während die Papierfasern zum grössten Theil aufgeweicht und mit dem Wasser entfernt wurden. Die so erhaltene Masse, die nach Aussehen und Consistenz ein wenig an Weizengluten erinnerte, wurde successiv mit 0,01proc. Kalilauge, 0,02proc. Essigsäure und Wasser gründlich gewaschen, worauf sie mit 30 cbcm. dest. Wasser in eine inwendig versilberte Metallröhre eingeschlossen im Paraffinbad während 5 Stunden auf 105—108° C. erwärmt wurde. Die Häute lösten sich dabei ohne Rest zu einer klaren, farblosen Lösung, die, nachdem die Papierreste abfiltrirt worden und die Lösung einen Tag in Zimmertemperatur gestanden hatte, zu einem durchsichtigen Gelée von solcher Festigkeit erstarrte, dass das Gefäss umgedreht werden konnte, ohne dass etwas von seinem Inhalt herausfiel.

Nachdem der Gelée durch gelinde Erwärmung aufgelöst und dann mit 2 Volum Wasser verdünnt worden war, wurde sein Verhalten zu qualitativen Reagenzen geprüft. Die Lösung verhielt sich hierbei ohne Ausnahme, sowohl in positiver wie negativer Hinsicht, wie eine Lösung gewöhnlichen, reinen Glutins, weswegen ein Aufzählen ihrer Reactionen an dieser Stelle zwecklos wäre[1]).

---

[1]) Besonders wurde die Flüssigkeit, nachdem sie mit Salzsäure gekocht war, mittelst Trommer'scher Probe geprüft, was vollkommen negative Reaction ergab.

In Betracht des typischen Vermögens zu gelatiniren und der qualitativen Reactionen ist es deutlich, dass beim Lösen der Häute Glutin gebildet wurde und dass diese selbst folglich aus Collagen bestehen. Dieses Resultat scheint mit Cahn's Angabe, dass die Häute bei seinem Versuche eine nicht gelatinirende Lösung bildeten, unvereinbar; die Veranlassung hierzu ist jedoch leicht einzusehen: Cahn erhitzte die Mischung während 16 Stunden auf 120° C., eine Hitze, die hinreichend intensiv ist, um in der Regel jeder Glutinlösung ihr Vermögen zu gelatiniren fortzunehmen; dass die Lösung eine «gelbbraune» Farbe annahm, spricht schon an und für sich dafür, dass die Erhitzung gar zu weit getrieben wurde.

Mit den übrigen feinen Häuten der lichtbrechenden Medien: der Descemet'schen Haut und der Linsenkapsel, haben die hautartigen Bildungen des Glaskörpers von chemischem Gesichtspunkte aus somit nichts gemeinsam, sondern können in dieser Hinsicht mit mehr Grund zu den typischen Bindegewebe-Bildungen geführt werden.

Das Kammerwasser.

Im Ganzen betrachtet verräth das Kammerwasser eine unverkennbare Aehnlichkeit mit der Glasflüssigkeit in Bezug auf seine chemische Zusammensetzung: derselbe hohe Wassergehalt und dieselbe Armuth an Proteïnstoffen. Eine Untersuchung der Proteïnstoffe dieser Flüssigkeit habe ich aus gewissen Gründen nicht selbst vorgenommen. Theils schien mir dieselbe a priori wenig Interessantes zu versprechen, theils, und das war der massgebendste Grund, schien mir das Erhalten eines einigermassen reichlichen und zugleich reinen Untersuchungsmaterials eine missliche Sache. Besonders schreckte mich der Umstand ab, dass beim Präpariren einer grösseren Anzahl Augen die Linsenkapsel leicht lädirt und so eine eventuelle Zumischung von Linseneiweiss nicht nur schwer zu vermeiden, sondern auch in solchem Fall unmöglich zu controlliren wäre, weswegen man schwierig auf die Zuverlässigkeit des Materials rechnen könnte.

Was daher die Kenntniss der Kammerwasser-Proteïnstoffe anbelangt, sind wir also ausschliesslich auf früher ausgeführte Versuche angewiesen. Aus diesen entnehmen wir, dass im Kammerwasser regelmässig Eiweissstoff nachgewiesen werden kann. Seine Menge stellt sich jedoch sehr unbedeutend, wie theils directe Bestimmungen von Lohmeier[1]) (0,05 %)[2]), v. Jäger[3]) (0,05 %) und Cahn[4]) (0,08 %), theils die Aussprüche einiger anderer Forscher deutlich an den Tag legen.

Berzelius[5]) schätzt die Menge des Eiweiss auf «knapp mehr als eine Spur». Jesner[6]) erhielt «bei Erhitzen eine deutliche Trübung, welche sich bei Zusatz von kleinen Mengen Essigsäure zu einer feinflockigen Ausscheidung gestaltete».

Zum Schluss führt Dogiel[7]) an, dass der Eiweissgehalt ein so geringer war, «dass ich Anfangs Gefahr lief, dasselbe gänzlich zu übersehen».

Nach Cahn's Angabe sollte die kleine Eiweissmenge, die dem Kammerwasser zukommt, zu ungefähr gleichen Theilen aus Serumglobulin und Serumalbumin bestehen.

Das Vorkommen einer Mucinsubstanz in dieser Flüssigkeit findet sich nirgends angegeben, und darin sollte ein Unter-

---

[1]) Loc. cit.

[2]) Dieser Werth ist der von Lohmeier wirklich gefundene. In seiner Tabelle über die Zusammensetzung des Kammerwassers führt er «0,12 % Natronalbuminat» an, wozu er auf dieselbe unzweckmässige Rechnungsweise gelangt, wie auf Seite 245 angeführt ist. Dagegen dürfte die Entstehung von Frerich's Angabe: «0,32 % Natronalbuminat» nicht nur durch diese Rechnungsweise zu erklären sein, sondern erscheint es wahrscheinlich, dass ein oder der andere Irrthum dabei begangen worden ist, da dieser Werth in so bedeutendem Grade von allen anderen unter sich übereinstimmenden Angaben abweicht.

[3]) Ueber die Einstellungen des dioptrischen Apparates etc. Wien (1861).

[4]) Loc. cit.

[5]) Loc. cit.

[6]) Der Humor aqueus des Auges in seinen Beziehungen zu Blutdruck und Nervenreizung. Archiv f. die gesammte Physiologie (Pflüger's), Bd. 23, S. 14 (1880).

[7]) Loc. cit.

schied zwischen dem Kammerwasser und der Glasflüssigkeit liegen können. Doch scheint mir dieser Umstand die Möglichkeit nicht vollständig auszuschliessen, dass auch das Kammerwasser Mucin in geringer Menge enthält, da nämlich keiner der Verfasser, die Mucin als einen Bestandtheil der Glasflüssigkeit angeben, das Kammerwasser untersucht haben, dagegen die meisten von denen, die dem Kammerwasser eine chemische Untersuchung gewidmet haben, den Mucingehalt der Glasflüssigkeit entweder nicht genannt (Berzelius, Frerichs, Dogiel) oder direct verneint haben (Lohmeier, Cahn). Aus diesem Gesichtspunkte ist das Kammerwasser erneuter Prüfungen werth.

Chemische Untersuchungen über die Mineralstoffe der Knochen und Zähne.

Von

Dr. S. Gabriel.

(Mittheilung aus dem thierchemischen Institut der Universität Breslau.)

(Der Redaction zugegangen am 11. Juli 1893.)

Von allen Geweben des Thierkörpers scheinen die Knochen und Zähne einer chemischen Untersuchung am leichtesten zugänglich zu sein. Ihr Reichthum an Mineralstoffen weist ihnen eine Ausnahmsstellung zu, welche der scharfen morphologischen Abgrenzung dieser Gebilde entspricht, und der Erforschung ihrer qualitativen und quantitativen chemischen Zusammensetzung in hohem Maasse zu statten kommt. Während eine einigermaassen erschöpfende Analyse des Fleisches, Blutes u. s. w. zu den schwierigsten und doch nur unvollkommen lösbaren Aufgaben der analytischen Chemie gehört, lässt sich eine Untersuchung der Knochen in ihrem wesentlichsten Theile auf eine Mineralanalyse zurückführen, deren Methoden ungleich einfacher und genauer sind und um so vollkommener zum Ziele führen, als die Zahl der in den Knochen vorkommenden Stoffe eine relativ beschränkte ist.

Es darf daher nicht Wunder nehmen, wenn das dankbare Gebiet der Knochenchemie eine ausnehmend reiche Zahl von Bearbeitern gefunden hat. Wir besitzen nicht nur eine erdrückende Fülle von einzelnen Arbeiten und Monographien

über diesen Gegenstand, sondern auch grosse Werke, in welchen das in der Litteratur verstreute überreiche Material gesammelt und nach einheitlichen Gesichtspunkten geordnet ist. Trotzdem wäre es verfehlt, die Frage nach der Zusammensetzung der Knochen als abgeschlossen zu betrachten oder auch nur anzunehmen, dass sie ihrem Abschluss nahe geführt sei. Wir müssen im Gegentheil zugeben, dass selbst Fragen von fundamentaler Bedeutung, wie diejenige nach der Zugehörigkeit mancher Stoffe zur eigentlichen Knochensubstanz, noch ihrer endgültigen Lösung harren. Der Grund dafür liegt theils in der Unzulänglichkeit der Mittel, welche früheren Forschern zu Gebote standen, noch mehr aber in der Besonderheit der Ziele, welche sie mit ihren Arbeiten verfolgten.

Die Methoden der quantitativen Analyse waren noch am Anfange und sogar in der Mitte dieses Jahrhunderts nicht in allen Theilen soweit ausgebildet, um in Fragen von einschneidender Bedeutung das entscheidende Wort sprechen zu können. Wenn wir uns vergegenwärtigen, in welcher rohen und zum Theil auf ganz irrige Voraussetzungen gegründeten Art die Kohlensäure in den Knochen früher bestimmt wurde, so genügt dieser Rückblick, um uns zu der Erkenntniss zu bringen, dass diejenigen Knochenanalysen, welche weiter als fünfzig Jahre zurückdatiren, für uns ein vorwiegend historisches Interesse besitzen.

Auch unter den späteren Analysen finden sich solche, welche nur einen bedingten Werth haben, und zwar weniger wegen der Ungenauigkeit der Methoden, nach denen sie angestellt sind, als um des Materials willen, auf das sie sich beziehen. Bei den eigenartigen Strukturverhältnissen der Knochen ist die für die Vorbereitung derselben zur Analyse nothwendige Reinigung eine nicht immer leichte und doch sehr bedeutsame Aufgabe. Viele von den grossen und regellosen Schwankungen, denen wir in den Resultaten verschiedener Forscher begegnen und welche uns die Beurtheilung ihrer Analysen so sehr erschweren, können wir uns nur durch die mangelhafte Reinigung des Ausgangsmaterials erklären. Nichtsdestoweniger wäre es ungerecht, den betreffenden Forschern

aus der Nichtbeachtung eines so wichtigen Moments einen Vorwurf zu machen. Die Ideen, von denen sie sich bei ihren Analysen leiten liessen, waren eben ganz andere, als diejenigen, welche der Chemiker bei der Analyse eines Minerals im Auge hat, und erforderten demgemäss auch eine gesonderte Methodik der Untersuchung. Wir berühren damit eine Thatsache, welche bereits oben kurz angedeutet worden ist und noch etwas ausführlicher erörtert werden soll, weil sie auf die Entwicklung der Chemie der Knochen grossen Einfluss ausgeübt hat.

Wenn wir die Litteratur über die Zusammensetzung der Knochen durchmustern, so fällt uns gegenüber dem Reichthum an einzelnen diesem Thema gewidmeten Arbeiten eine gewisse Einseitigkeit in der Behandlungsweise des Letzteren auf. Es handelt sich nämlich weniger um die Zusammensetzung der Knochen an sich, als vielmehr um die Schwankungen und Veränderungen derselben, welche wir beobachten, wenn wir das Skelett verschiedener Thiere oder die einzelnen Knochen eines und desselben Skeletts mit einander vergleichen; oder wenn wir ferner die Knochen gleichartiger Thiere in Parallele stellen, welche unter verschiedenen Existenz- und Ernährungs-Bedingungen aufgewachsen sind. Wir haben es demnach mit vergleichenden Untersuchungen zu thun, deren Schwerpunkt nicht auf dem Gebiete der Chemie, sondern auf dem der Zoologie, bezw. Physiologie und Biologie liegt und in denen die chemische Analyse nicht als Selbstzweck, sondern nur als Mittel zum Zweck figurirt. Wir finden es daher erklärlich, wenn in den eben gekennzeichneten Arbeiten die Zahl der Analysen eine grössere Rolle spielt, als ihre Genauigkeit und Vollständigkeit. In der That begegnen wir in der Unmenge von Knochenanalysen recht selten solchen, welche auf Vollständigkeit Anspruch machen können. Die meisten Autoren begnügen sich damit, die vier Hauptbestandtheile der Knochen, Kalk, Magnesia, Phosphorsäure und Kohlensäure zu bestimmen, während sie die in geringerer Menge vorkommenden Stoffe als für ihre Zwecke belanglos unberücksichtigt lassen.

Wenn nun auch zugegeben werden muss, dass eine derartige Versuchsanordnung gestattet, den beabsichtigten Vergleich strikt durchzuführen und den Interessen des Zoologen und Mediciners vollauf gerecht zu werden, so ist doch andererseits klar, dass der Chemiker dabei zu kurz kommen muss. Eine unvollständige Analyse bietet nicht nur alle die Nachtheile, welche einem Fragment seiner Natur nach überhaupt anhaften, sondern macht z. B. die so wichtigen Erörterungen über die Basicität oder Acidität des Knochenphosphats zur Unmöglichkeit. Alle Betrachtungen über die Constitution der Knochen, welche sich auf unvollständige Analysen stützen, verlieren sich weit in das Gebiet der grauen Theorie und müssen vom Standpunkt der exacten Forschung als verfrüht bezeichnet werden. Eine Discussion über Constitutionsfragen kann eben erst beginnen, wenn die chemische Analyse, als natürliche Basis derselben, abgeschlossen ist.

Scheiden wir aus der Gesammtheit aller einschlägigen Arbeiten diejenigen aus, in welchen das Interesse des Mediciners überwuchert oder doch mit demjenigen des Chemikers collidirt, so schrumpft das reiche Material zu einer unverhältnissmässig kleinen Auslese von Untersuchungen zusammen, welche geeignet sind, zum Ausgangspunkt rein chemischer Betrachtungen zu dienen. Wenn nun schon die geringe Anzahl dieser Arbeiten eine Wiederholung und Ergänzung derselben wünschenswerth erscheinen lässt, so rechtfertigt sich dieser Wunsch in noch viel höherem Grade durch den Umstand, dass die verschiedenen Forscher in ihren Resultaten und vor allen Dingen in der Deutung derselben erheblich von einander abweichen, ja bisweilen ganz entgegengesetzte Wege wandeln.

Von diesen Erwägungen liess ich mich bei Anstellung der vorliegenden Versuche leiten. Dieselben schliessen alle Fragen rein physiologischer oder biologischer Natur aus dem Bereich ihrer Betrachtungen aus und haben die chemische Zusammensetzung der Knochen und Zähne als solche zum Gegenstand; sie beziehen sich ferner nur auf die mineralischen Bestandtheile der Knochen. Bei einer derartigen Beschränkung

des Themas konnte ich es nicht als meine Aufgabe betrachten, möglichst viele Objecte zu analysiren, vielmehr genügte es, die Untersuchung auf wenige Analysen zu beschränken, diese aber in möglichster Genauigkeit und Vollständigkeit zu geben.

I.

Ist das Fluor ein wesentlicher Bestandtheil der Knochenasche und in welchen Mengen findet sich dasselbe vor?

Unter den noch schwebenden und der Aufklärung bedürftigen Fragen über die Zusammensetzung der Knochen muss diejenige nach dem Fluorgehalt derselben entschieden als die brennendste bezeichnet werden. Sie ist nicht nur an sich wichtig, sondern hängt auch aufs Innigste mit Fragen gleicher Art zusammen, deren Beantwortung die Möglichkeit einer klaren Vorstellung über den chemischen Bau der Knochensubstanz geradezu bedingt. Es war daher natürlich, dass dieser Gegenstand zunächst den Ausgangspunkt und späterhin das leitende Princip meiner Untersuchungen bildete.

Der Streit, ja man kann fast sagen der Kampf darüber, ob das Fluor ein wesentlicher Bestandtheil der Knochenasche sei, hat mehrere Generationen von Chemikern und Physiologen bewegt und während dieser Zeit so verschiedene Phasen durchlaufen, dass er am besten im Lichte seiner historischen Entwicklung dem Verständniss näher gebracht werden kann[1]).

Die meisten Chemiker bekannten sich am Ende des vorigen Jahrhunderts auf Grund ihrer Analysen zu der Ansicht, dass die in den Knochen vorhandenen Säuren nicht hinreichten, um die Summe der Basen zu sättigen. Sie standen daher vor der Wahl, entweder ein basisches Salz in den Knochen anzunehmen oder nach einer neuen Säure zu fahnden, welcher die Aufgabe zufiel, die überschüssige Basis zu neutralisiren. Während die erstere Eventualität als teleologisch unwahrscheinlich wenig beachtet wurde, fand die zweite um so mehr Berücksichtigung, als sie dem Forschungstrieb einen

---

[1]) Ich folge hierbei theilweise den Angaben von Zalesky.

mächtigen Anreiz bot. Als nun Morichini (1)[1]) 1803 Fluor im fossilen Elfenbein entdeckte, schien die gesuchte Säure gefunden zu sein. Kurz darauf konnte John (2) Fluor in Mammuth-Knochen nachweisen. Auch Klaproth (3) fand Fluor in fossilen Elephantenzähnen, betrachtete dasselbe jedoch als Metamorphose von Phosphorsäure. 1805 vereinigte sich Morichini mit Gay-Lussac (4), um seine früheren Untersuchungen zu wiederholen und zu erweitern und gelangte zu dem Resultat, dass auch die Thiere der Gegenwart Fluor in ihren Knochen enthielten. Diese zweite Versuchsreihe wurde jedoch ebenso angefochten wie die erste. Fourcroy und Vauquelin (5), sowie Wollaston und Brande (6) bestätigten zwar das Vorkommen des Fluors in vorweltlichen Knochen, bestritten aber die Anwesenheit dieses Elementes im frischen Knochengewebe. 1807 bemächtigte sich Berzelius (7) des Gegenstandes und brachte die Morichini'sche Ansicht wieder zu vollen Ehren. Er begnügte sich nicht nur mit dem qualitativen Nachweis des Fluors in den Knochen des Menschen und verschiedener Thiere, sondern verstieg sich sogar zu quantitativen Bestimmungen, auf Grund deren er den Fluorgehalt der Knochen zu 1—2% schwankend angab. Berzelius (8) hat diese Zahlen später selbst als irrthümlich bezeichnen müssen, als er die Mangelhaftigkeit des von ihm benutzten Verfahrens zur Fluorbestimmung erkannt hatte. Auch die gewichtige Stimme des schwedischen Chemikers konnte die Gegnerschaft nicht zum Schweigen bringen. Den hartnäckigsten Widerstand leisteten Rees (9), sowie Girardin und Preisser (10). Im Lauf der vierziger Jahre trat immerhin eine gewisse Klärung der Ansichten insofern ein, als die meisten Chemiker auf die Seite von Berzelius traten, jedoch ausdrücklich hervorhoben, dass die frischen Knochen viel weniger Fluor enthielten, als die vorweltlichen. In diesem Sinne sprechen sich Erdmann (11), Marchand (12), Middleton (13), Daubeny (14), v. Bibra (15) und Wilson (16) aus. Manche von diesen Forschern glaubten.

[1]) Die eingeklammerten Zahlen beziehen sich auf die am Schlusse dieser Arbeit gegebene Litteratur-Uebersicht.

dass der Fluorgehalt der Knochen geradezu eine Funktion ihres Alters sei und deshalb als werthvolles Hilfsmittel zur Altersbestimmung prähistorischer Knochen benutzt werden könne. Im Jahre 1849 veröffentlichte W. Heintz (17) eine Reihe recht genauer Analysen, welche ihn zu dem Resultate führten, dass in den Knochen circa 2 % überschüssige Basis vorhanden seien. Da nun in damaliger Zeit kaum noch Jemand an dem Vorhandensein des Fluors in den Knochen zweifelte, und die Anstellung der Aetzprobe überdies positive Resultate gab, so hielt sich Heintz für berechtigt, diejenige Fluormenge in den Knochen anzunehmen, welche dem überschüssigen Kalk äquivalent war. Um eine weitere Stütze für die Richtigkeit seiner Anschauung zu gewinnen, führte er eine Fluorbestimmung in folgender Art aus:

4 gr. Knochenpulver wurden verascht, die Asche mit der dreifachen Menge Natriumcarbonat zusammengeschmolzen, die Schmelze mit Wasser extrahirt. Das Filtrat wurde auf ein kleines Volumen eingeengt, mit Salzsäure vorsichtig angesäuert, einen Tag lang unter einer Glasglocke neben einer Lösung von Kaliumhydroxyd stehen gelassen, mit einer frisch filtrirten Mischung von Chlorcalcium und Ammoniak gefällt und der Niederschlag ($Ca_3(PO_4)_2 + CaF_2$) gewogen. Durch Abrauchen mit Schwefelsäure entfernte Heintz das Fluor. Hierauf rührte er den Niederschlag mit Wasser an, fällte den Kalk mit Alkohol als Calciumsulphat, im Filtrat davon die Phosphorsäure als Ammoniummagnesiumphosphat. Aus diesen Daten «berechnet» Heintz den Fluorgehalt der Knochen zu 1 % = 2,05 % Fluorcalcium, oder der Knochenasche zu 2,97 % Fluorcalcium, was mit den Berzelius'schen Angaben und seinen eigenen Anschauungen leidlich übereinstimmt.

Heintz giebt selbst zu, dass diese Bestimmung auf Genauigkeit keinen Anspruch machen könne, ist jedoch der Meinung, dass bereits die Quantität des basischen Ueberschusses einen genügend sicheren Anhaltspunkt für den Fluorgehalt darbiete. Ich habe die Methode von Heintz etwas näher beleuchtet, weil sie für die damalige Behandlung der vorliegenden Frage charakteristisch ist und deutlich zeigt, dass

nur ein auf theoretische Anschauungen gegründetes Vorurtheil den Autor veranlassen konnte, seiner Fluorbestimmung eine nennenswerthe Bedeutung beizumessen.

F. Hoppe-Seyler (18) konnte bei seinen Arbeiten über den Zahnschmelz das Fluor im unentwickelten Schweineschmelz nicht nachweisen, dagegen fand er es mit Sicherheit im ausgebildeten Menschen- und Schweineschmelz. Vergleichende, auf die Aetzprobe gegründete Versuche mit Calciumphosphat und Fluorcalcium belehrten ihn, dass der Gehalt des Schmelzes an Fluorcalcium 2 % nicht erreichen kann. Aus der Thatsache ferner, dass der aus der salzsauren Lösung des veraschten Schmelzes mit Ammoniak fallende Niederschlag recht genau der Formel $3\,CaO.P_2O_5$ entspricht, folgert Hoppe-Seyler, dass sich nur Spuren von Fluor im Schmelz der Zähne befinden. — Letzterer Schluss gründet sich auf eine Voraussetzung, deren Anfechtbarkeit sich auch aus vorliegender Untersuchung ergeben wird (vergl. S. 291 und 292).

Zalesky (20) hat bei seinen Untersuchungen über die Knochen dem Fluor eine ganz besondere Berücksichtigung zu Theil werden lassen. In der richtigen Erkenntniss, dass die bisherigen Zahlenangaben über dieses Element auf durchaus unsicherer Grundlage ruhen, hat er den anerkennenswerthen Versuch gemacht, den vielumstrittenen Stoff nach einer «directen» Methode zu bestimmen. Er wählte zu diesem Zwecke ein von v. Kobell (19) angegebenes Verfahren, welches er auf Hoppe-Seyler's Rath für den speciellen Fall der Knochenanalyse entsprechend modificirte. Die Methode beruht auf der Gewichtsabnahme, welche gutes, schwer schmelzbares Kaliglas erleidet, wenn man dasselbe längere Zeit bei mässiger Wärme der gleichzeitigen Einwirkung von concentrirter Schwefelsäure und einer fluorhaltigen Substanz aussetzt. Fresenius bemerkt (26) mit Recht, dass die Zuverlässigkeit dieser Bestimmungsweise noch der directen Beweise bedürfe. Immerhin wird man Zalesky zugestehen müssen, dass die von ihm befolgte Methode nie zu denselben groben Irrthümern führen konnte, wie die von Berzelius und Heintz in Anwendung gebrachte. Seine Zahlen haben

daher auch heute noch als Maximalwerthe eine nicht zu unterschätzende Bedeutung.

Ich gebe sie nachstehend wieder:

Thierart.	F. %	CaF_2. %.
Ochse	0,300	0,6163
Mensch	0,229	0,4714
Testudo graeca	0,204	0,4187
Foss. Rhinoceros-Zahnschmelz . . .	0,284	0,5922

Diese Resultate sind in doppelter Beziehung bemerkenswerth. Einmal weisen sie überraschend niedrige Fluormengen auf und dann lassen sie einen Unterschied im Fluorgehalt frischer und fossiler Knochen nicht erkennen.

Die Ergebnisse von Zalesky's Untersuchungen haben in der Folgezeit nicht die Beachtung gefunden, welche sie verdienen. Viel mag dazu der Umstand beigetragen haben, dass die neueren Forscher ihr Hauptaugenmerk auf eine Beobachtung lenkten, welche sämmtliche Analytiker bestätigten, ohne eine einwandfreie Deutung dafür zu geben. Führt man nämlich von allen bekannten Bestandtheilen der Knochen quantitative Bestimmungen aus, so ergänzt sich die Summe der erhaltenen Procentzahlen nicht zum vollen Hundert. Sie schwankt ungefähr zwischen 98,25 und 99,25 und nähert sich in der Regel der Zahl 99. Da nun fremdartige Stoffe bisher in der Knochenasche nicht aufgefunden werden konnten, so musste wiederum das Fluor dazu herhalten, das Manco zu decken. Die Fresenius'sche Methode der Fluorbestimmung (21), welche in demselben Jahre, wie die Untersuchungen von Zalesky erschien, hätte zwar ein vortreffliches Mittel geboten, über die Berechtigung dieses Verfahrens zu entscheiden; dieselbe erfordert aber zu ihrem Gelingen die peinliche Innehaltung so vieler Vorsichtsmassregeln, dass nur ein sehr umsichtiger, erfahrener und geübter Analytiker sich mit einiger Aussicht auf Erfolg an sie heranwagen darf; sie ist deshalb im Dienste der Knochenanalyse nicht recht zur Geltung gelangt. Vielmehr bürgerte sich mehr und mehr der Brauch

ein, das Fluor in den Knochen «aus der Differenz» zu bestimmen. Da nun das oben erwähnte Deficit die Quantität des Fluors nicht unmittelbar angibt, sondern noch um die dem supponirten Fluorgehalt äquivalente Menge Sauerstoff vermehrt werden muss; da ausserdem die betreffenden Analysen nicht immer ganz vollständig waren, so gelangte man auf diesem Wege unter Umständen zu Werthen, welche die alten Berzelius'schen noch erheblich überschritten. H. Weiske (30) findet z. B. in der Asche von Hühnerknochen 5 % Fluor und darüber; ebenso berechnet E. Hiller (28) den Fluorgehalt verschiedener Gänseknochen zu 5—8 %. Weiske macht selbst ausdrücklich darauf aufmerksam, dass die von ihm und seinen Schülern angegebenen Zahlen nicht ohne Weiteres als reiner Ausdruck des Fluorgehalts der Knochen angesehen werden können; er geht auf die präcise Bestimmung dieses Elementes nicht näher ein, weil dies für die von ihm behandelten biologischen Fragen völlig belanglos ist.

In neuester Zeit, als der experimentelle Theil der vorliegenden Arbeit bereits abgeschlossen war, veröffentlichte A. Carnot (31) ein Verfahren zur Bestimmung des Fluors, welches sich im Princip an die älteren Methoden anlehnt; er führt das Fluor auch in Fluorsilicium über, fängt dasselbe aber nicht, wie Fresenius, in gewogenen Absorptionsröhren auf, sondern leitet das Gas in eine Lösung von Fluorkalium und wägt das hierbei entstehende Kieselfluorkalium. Carnot (32) hat nach dieser Methode eine Anzahl Fluorbestimmungen ausgeführt und gelangt bei frischen Knochen zu folgenden Resultaten:

I. Mittelstück eines menschlichen Schenkels.
II. Kopf desselben.
III. Schenkelknochen des Ochsen.
IV. Knochen der Seekuh.
V. Schenkelknochen des Elephanten.
VI. Elephantenzahn.
VII. Elfenbein.

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.
CaF_2 % . . .	0,35	0,37	0,45	0,63	0,47	0,43	0,20
F %	0,17	0,18	0,22	0,31	0,24	0,21	0,10

Carnot's Zahlen bewegen sich, wie ersichtlich, etwa in denselben Grenzen, wie die von Zalesky mitgetheilten; sie fallen zum Theil sogar noch erheblich niedriger aus. Wenn man berücksichtigt, welche Fülle von Vorsichtsmassregeln nothwendig ist, um das Fluor quantitativ in Fluorsilicium überzuführen, dass man hierbei ebenso leicht zu viel als zu wenig Fluor erhalten kann, so wird man mit der Möglichkeit zu rechnen haben, dass obige Zahlen ganz oder zum Theil in die analytischen Fehlergrenzen fallen.

Fast gleichzeitig mit Carnot theilten Brandl und Tappeiner (33) ihre Versuche über Ablagerung von Fluorverbindungen im Organismus nach Fütterung mit Fluornatrium mit. Die Fluorbestimmungen wurden hierbei nach der Fresenius'schen Methode ausgeführt, welche Brandl in der Weise modificirte, dass er sich zur Innehaltung der constanten Temperatur von 160° eines Oelbades bediente. Die beiden Autoren, welche im Verlauf ihrer Untersuchungen sehr viele Bestimmungen ausführten, haben offenbar in der Handhabung der Fresenius'schen Methode eine grosse Uebung erlangt; es ist deshalb sehr bemerkenswerth, dass sie in der Asche von normalen Hundeknochen kein Fluor fanden, obgleich sie die stattliche Menge von 4 gr. zur Analyse verwandten.

Wenn wir aus vorstehender Litteraturübersicht das Facit ziehen, so müssen wir constatiren, dass die nach directen und vertrauenswürdigen Methoden angestellten Analysen von Zalesky, Cossa, Brandl und Tappeiner entweder sehr wenig oder gar kein Fluor in den Knochen finden liessen; dass demnach die neueste Entwicklung der alten Streitfrage sich auf die Seite derer neigt, welche die Anwesenheit von Fluor in den Knochen überhaupt läugnen.

Dem aufmerksamen Beobachter kann es nicht entgehen, dass mit dem Augenblick, wo das Fluor aus der Reihe der normalen Knochenbestandtheile ausscheidet, das bei der Berechnung der Knochenanalysen sich ergebende Deficit eine neue Erklärung erheischt. Beide Momente stehen in innigster Beziehung zu einander; es erschien mir daher wünschens-

werth, beide gemeinsam zu behandeln. Dementsprechend habe ich mir bei meinen Untersuchungen zunächst folgende Fragen vorgelegt:

1. Tritt das Deficit auch bei möglichst genauer und vollständiger Analyse der Knochenasche zu Tage?
2. Schwankt die Grösse des Deficits je nach der Art der zur Analyse der Asche angewandten Methode?
3. Steht die Grösse des Deficits in einem Abhängigkeitsverhältniss zu der etwa vorhandenen Fluormenge?

Als Analysenobject wählte ich Rinderzähne, weil dieselben verhältnissmässig leicht analysenrein zu beschaffen sind, und weil nach einer vielverbreiteten Ansicht gerade die Zähne der Hauptsitz des Fluors sein sollen. Die oberflächlich gereinigten Zähne wurden gemahlen und hintereinander mit Wasser, Alkohol und Aether erschöpft. Der Extractionsrückstand wurde erst bei gelinder Wärme verkohlt, dann zur lebhaften Rothgluth erhitzt und schliesslich über dem Gebläse weiss gebrannt. In der so erhaltenen Asche konnte Kalk, Magnesia, Kali, Natron, Phosphorsäure, Kohlensäure, Chlor nachgewiesen werden. Kieselsäure, welcher ich wegen ihres Einflusses auf den Fluornachweis meine besondere Aufmerksamkeit zuwandte, war nicht, Schwefelsäure nur in unbestimmbaren Spuren zugegen. Die Kohlensäure bestimmte ich nach Fresenius-Kolbe; die Alkalien und Chlor in allgemein üblicher Weise. Zur Bestimmung des Kalks, der Magnesia und Phosphorsäure bediente ich mich nachstehender fünf Methoden:

I. Die salzsaure Lösung der Asche wurde mit Ammoniak bis zur Entstehung eines starken Niederschlages versetzt, letzterer in Essigsäure gelöst und der Kalk durch Ammoniumoxalat als Calciumoxalat gefällt: im Filtrat schied sich beim Uebersättigen mit Ammoniak die Magnesia mit der äquivalenten Menge Phosphorsäure aus; ebenso wurde der Rest der Phosphorsäure durch Magnesiamixtur als Ammoniummagnesiumphosphat gefällt.

II. Abscheidung der Phosphorsäure nach der Molybdänmethode (Fresenius, Quant. Analyse, 6. Auflage, Bd. 1, S. 404).

III. Trennung der Phosphorsäure von den Basen durch Eisen (Fresenius a. a. O., S. 409).

IV. Trennung der Phosphorsäure von den Basen durch Zinn (Fresenius a. a. O., S. 406).

V. Trennung der Phosphorsäure von den Basen durch Silber (Fresenius a. a. O., S. 415).

Die hierbei erhaltenen Resultate[1]) sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Methode.	CaO. %	MgO. %	P_2O_5. %	K_2O. %	Na_2O. %	CO_2. %	Cl. %
I.	53,65	1,56	41,50	0,25	1,13	0,59	0,10
II.	—	—	41,64	»	»	»	»
III.	53,68	1,60	41,60	»	»	»	»
IV.	53,71	1,53	—	»	»	»	»
V.	53,65	1,53	41,47	»	»	»	»
Mittel.	53,67	1,56	41,55	—	—	—	—

Wie zu erwarten, stimmen die nach verschiedenen Methoden erhaltenen Werthe nicht geradezu absolut überein, die Schwankungen sind jedoch so geringfügig, dass sie die Grösse des sich etwa ergebenden Deficits nicht in nennenswerthem Grade beeinflussen, geschweige denn dasselbe ganz zum Verschwinden bringen können. Das Manco würde auch dann in fast vollem Umfange bestehen bleiben, wenn wir die Maximalzahlen combinirten. Stellen wir die Mittelwerthe zusammen,

CaO . . .	53,67,
MgO . . .	1,56,
K_2O . . .	0,25,
Na_2O . . .	1,13,
P_2O_5 . . .	41,55,
CO_2 . . .	0,59,
Cl	0,10,
	98,85,

so ergibt deren Summe 98,85, also eine Zahl, wie sie bei den meisten Analysen beobachtet wird und wesentlich dazu beigetragen hat, die Annahme von dem Vorhandensein grösserer

[1]) Dieselben stellen die Mittelzahlen von mindestens zwei gut übereinstimmenden Analysen dar.

Fluormengen in den Knochen zu unterstützen. Dem Einwand gegenüber, dass die Verschiedenartigkeit der oben skizzirten Methoden sich nicht eigentlich auf die Bestimmung der Knochenbestandtheile, sondern auf deren Trennung erstreckt, muss hervorgehoben werden, dass die Zuverlässigkeit der Fällung des Kalks als Oxalat und der Phosphorsäure als Ammoniummagnesiumphosphat wohl über jedem Zweifel erhaben ist, und eben nur die Trennung der Phosphorsäure von den Basen allenfalls zu Misstrauen Anlass geben kann. Die mitgetheilten Analysen sind jedoch geeignet, alle Bedenken zu zerstreuen. Wir müssen demnach die Existenz des Deficits als gesichert betrachten und haben nun zu prüfen, ob und inwieweit dasselbe auf Rechnung des Fluors zu setzen ist.

Wollten wir das Fluor allein für das von uns beobachtete Manco von 1,15 % verantwortlich machen, so wären wir gezwungen, in der Asche der Rinderzähne den ansehnlichen Fluorgehalt von 2 % anzunehmen. Wurde nun mit der muthmaasslich ziemlich fluorreichen Zahnasche die bekannte Aetzreaction angestellt, so fiel dieselbe äusserst schwach aus und liess die Gegenwart des Fluors überhaupt zweifelhaft erscheinen. Es kamen nur Hauchbilder zum Vorschein, welche bekanntlich für die Anwesenheit des Fluors nicht streng beweisend sind. Mischte man dagegen der Asche 2 % Fluor in Form von reinem Fluorcalcium zu und stellten die Reaction unter sonst genau denselben Bedingungen an, so traten Aetzbilder auf, deren Schärfe nicht den geringsten Zweifel an dem Vorhandensein des Fluors aufkommen liess.

Ein anderes Resultat war auch kaum zu erwarten, wenn wir die Erfahrungen berücksichtigen, welche wir mit fluorhaltigen Mineralien zu machen Gelegenheit haben. Die gewöhnlichsten natürlichen Phosphate, Apatit, Phosphorit und ihre zahlreichen Varietäten kommen in ihrer Zusammensetzung der Knochenasche sehr nahe und weisen einen Fluorgehalt auf, welcher dem von uns in der Zahnasche muthmaasslich angenommenen annähernd entspricht. Prüft man nun diese Mineralien auf Fluor, so lässt allerdings die Aetzprobe wegen der gleichzeitig vorhandenen Kieselsäure bisweilen im Stich;

dagegen ist das Fluorsilicium ohne jede Schwierigkeit nachzuweisen und macht sich schon durch den Geruch in unangenehmster Weise bemerkbar. In Uebereinstimmung damit stehen die Beobachtungen in der Technik. Bekanntlich werden die Arbeiter der Superphosphatfabriken durch die aufsteigenden Dämpfe von Fluorwasserstoff und Fluorsilicium arg belästigt; auch an dem Mattwerden der Fensterscheiben ist die Wirkung der beiden Gase deutlich zu erkennen. In den Werken der Silesia hat man sogar versucht, die fluorhaltigen Dämpfe gleichzeitig unschädlich und nutzbar zu machen, indem man sie in Vorlagen leitet, in welchen sie sich unter Bildung von Kieselfluorwasserstoffsäure verdichten (D. R. P. 53045 und 55153).

Es genügte demnach schon die Anstellung weniger Reactionen, um mit Bestimmtheit nachzuweisen, dass der Fluorgehalt der Zahnasche nicht im Entferntesten hinreicht, um das von uns beobachtete Deficit erklärlich zu machen. Es fragte sich jedoch, ob das Fluor nicht wenigstens bis zu einem gewissen Grade an dem Zustandekommen des Mancos betheiligt ist.

Eine exacte Beantwortung dieser Frage konnte nur von quantitativen Fluorbestimmungen erwartet werden. Einige orientirende Vorversuche zeigten deutlich, dass wir es nur mit winzigen Fluormengen zu thun hatten, bei welchen auch die bewährte Fresenius'sche Methode die Grenze ihrer Anwendbarkeit erreicht. Ich griff deshalb auf die Aetzprobe zurück und suchte mir ein sicheres Urtheil über die Genauigkeit und Empfindlickeit derselben zu verschaffen, indem ich eine ganze Reihe vergleichender Versuche ausführte, welche theils an Zahnasche, theils an Mischungen derselben mit steigenden Mengen von reinem Fluorcalcium angestellt wurden. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben streng zu wahren, beobachtete ich hauptsächlich folgende Punkte:

Die zur Reaction benutzten Platintiegel hatten stets dieselbe Form und Grösse.

Das Gewicht der der Reaction unterworfenen Substanz betrug stets genau 1 gr.

Die Menge der zuzusetzenden Schwefelsäure war in allen Fällen auf 2,5 cbcm. bemessen.

Die zur Aufnahme des Aetzbildes (immer in Form eines F) bestimmten Glasplatten waren sämmtlich aus derselben Scheibe geschnitten, bestanden also aus derselben Glassubstanz.

Zur Erzielung einer gleichmässigen Temperatur wurden die fertig beschickten Tiegel auf einen geheitzten Wassertrockenschrank gestellt.

Die Reactionsdauer betrug 8 Stunden.

Ich habe im Ganzen etwa 60 Proben ausgeführt[1]) und bin zu ganz unzweideutigen Resultaten gelangt. Eine Mischung von 0,960 gr. Zahnasche und 0,040 gr. Fluorcalcium lieferte ein Aetzbild, welches man nicht nur sehen, sondern geradezu greifen konnte. Reducirte man das Fluor auf den zehnten Theil, also auf 0,2 %, so ist die Reaction immer noch sehr stark. Auch 0,1 procentige Mischungen geben Bilder, welche an Deutlichkeit nichts zu wünschen übrig lassen. Bei peinlicher Innehaltung aller für das Zustandekommen der Reaction nothwendigen und günstigen Bedingungen gelingt es noch 0,05 % Fluor nachzuweisen. Hier dürfte aber die Empfindlichkeit der Reaction ihre Grenze haben. Da die Schärfe der Bilder innerhalb gewisser Grenzen dem Fluorgehalt des Reactionsgemisches proportional ist, so kommt der Aetzprobe ein hoher diagnostischer Werth zu, welcher es gestattet, sehr kleine Fluormengen — allerdings nur diese — annähernd zu schätzen.

Wenn wir die gewonnenen Erfahrungen auf die Zahnasche anwenden, so können wir mit einer jeden Zweifel ausschliessenden Sicherheit behaupten, dass der Fluorgehalt derselben 0,1 % nicht erreicht. Berücksichtigen wir, dass indifferente Substanzen, wie Kieselsäure, Sand nur vereinzelt Hauchbilder geben, während letztere bei der Zahnasche ganz constant auftreten; erwägen wir ferner, dass wir mit der Aetzprobe noch 0,05 % Fluor deutlich nachweisen können, so werden wir der Wahrheit ziemlich nahe kommen, wenn wir

[1]) Die Reactionen wurden sowohl mit Glühasche wie mit der später zu beschreibenden Glycerinasche angestellt.

den Fluorgehalt der von uns analysirten Zahnasche auf höchstens 0,05 % normiren.

Es war nun wichtig, zu ermitteln, inwiefern dieses Resultat einer Verallgemeinerung fähig ist. Zu diesem Zwecke untersuchte ich in gleicher Weise verschiedene Rinderzähne anderer Provenienz, ferner Zahnschmelz und Zahnbein getrennt, ausserdem Menschen-, Hühner-, Gänse-, Rinder- und Kaninchen-Knochen. Das Ergebniss deckte sich fast vollständig mit dem zuerst erhaltenen. Es wurden nur Hauchbilder beobachtet, welche als Ausdruck für einen minimalen Fluorgehalt angesehen werden müssen. Die einzige Ausnahme bildeten die Rinderknochen, deren Analyse später noch mitgetheilt werden wird. Dieselben lieferten ein zwar schwaches, aber deutliches bleibendes Bild, welches immerhin auf einen Fluorgehalt von knapp 0,1 % schliessen liess.

Ich möchte noch erwähnen, dass ich auch die auf der Bildung von Fluorsilicium beruhende Reaction zu Rathe gezogen habe; dieselbe steht zwar hinter der Aetzprobe an Empfindlichkeit erheblich zurück, das gänzliche Versagen der Reaction war jedoch bemerkenswerth, weil es die Anwesenheit von Kieselfluorwasserstoffsäure ausschloss.

Die von uns gefundenen Fluorwerthe sinken noch unter das Niveau von Carnot's Zahlen; sie sind überhaupt höchst unbedeutend und nähern sich in bedenklichem Grade der Null. Wir müssen sogar mit der Möglichkeit rechnen, dass es auch gänzlich fluorfreie Knochen und Zähne gibt. Ein sicheres Mittel, um hierüber Gewissheit zu erlangen, existirt zur Zeit nicht, denn sowohl die Methode von Fresenius wie die Aetzprobe lassen im Stich, sobald es sich um wenige Hundertstel Procente Fluor handelt. Aus diesem Grunde beweist auch die vereinzelte Analyse von Brandl und Tappeiner (33) keineswegs, dass die von ihnen untersuchten Hundeknochen fluorfrei waren; ihr Werth liegt nur darin, dass sie irgend nennenswerthe Fluormengen in den Hundeknochen mit Sicherheit ausschliesst.

Aus unseren bisherigen Versuchen geht hervor, dass die Knochen und Zähne höchstwahrscheinlich etwas Fluor ent-

halten; die Menge dieses Stoffes ist jedoch sehr geringfügig, sie schwankt in der Regel zwischen 0 und 0,05 % und erreicht nur selten 0,1 %. Ausser dem Fluor muss in den Knochen noch ein anderer Stoff in grösserer Menge vorkommen, welcher sich im gewöhnlichen Gange der Analyse der Bestimmung entzieht und daher ein Deficit veranlasst. Das Letztere betrug in unserem speciellen Falle 1,15 %.

II.

Ueber eine Methode, die Mineralstoffe der Knochen und Zähne ohne Anwendung von Glühhitze zu isoliren.

Es ist allgemein üblich, die Analyse der Knochen an der Asche derselben, d. h. am Glührückstande auszuführen. Eine so gewaltsame Operation wie das Glühen bietet jedoch in analytischer Beziehung mannigfache Nachtheile, da sie uns die Bestandtheile der Knochen nicht unversehrt und unverändert überliefert und keine Garantieen für die wirkliche Constitution der Mineralstoffe im frischen Knochen bietet. Seit langer Zeit hat man diesem Uebelstande bei der Kohlensäure Rechnung getragen, indem man dieselbe nicht in der Asche, sondern im ursprünglichen Knochen bestimmt (22 und 23, 24). Bei anderen Bestandtheilen ist jedoch dieses Verfahren nicht ausführbar. Von den Bedenken, welche gegen die Benutzung der Glühasche geltend gemacht werden können, erschienen mir besonders zwei berücksichtigenswerth:

Das Fluorcalcium ist zwar ein recht beständiger Körper, es gibt jedoch beim Erhitzen mit Wasserdämpfen Fluorwasserstoff ab. Infolgedessen kann beim Veraschen fluorhaltiger organischer Substanzen Fluor verloren gehen, wenn man ihnen nicht säurebindende Stoffe zusetzt. Allerdings haben Brandl und Tappeiner (33) im Gegensatz zu dieser Anschauung bei ihren Fluorbestimmungen in Harn, Koth und Knochen dieselben Resultate gefunden, gleichgültig, ob sie mit oder ohne Zusatz von Kalk veraschten.

Unbedingt zu vermeiden ist aber das Glühen, wenn es sich darum handelt, die Frage nach einem etwaigen Gehalt der Knochen an chemisch gebundenem Wasser zu diskutiren.

Ueber diesen Punkt existiren nur einige Vermuthungen, welche der experimentellen Prüfung dringend bedürftig sind.

C. Aeby (23) hat das Veraschen der Knochen dadurch zu umgehen gesucht, dass er seine Analysen an fossilem Elfenbein ausführte, welches vollkommen frei von organischer Substanz war. Abgesehen davon, dass man zur Beschaffung dieses Materials auf seltene Zufälle angewiesen ist, kann dagegen, wie dies von F. Wibel (25) geschehen ist, der berechtigte Einwand erhoben werden, dass es gewagt ist, von der Zusammensetzung des fossilen Elfenbeins auf diejenige der frischen Knochen zu schliessen.

Nach vielen vergeblichen Versuchen, deren Aufzählung zu weit führen würde, habe ich in dem Glycerin ein Mittel gefunden, welches im Stande ist, den Knochen in der Hitze sämmtliche organische Substanz zu entziehen. Zur Extraction der letzten Spuren von Leim ist allerdings geraume Zeit erforderlich. Wesentlich abgekürzt konnte die Operation werden, wenn man dem Glycerin etwas Kaliumhydroxyd zusetzte. Ich benutzte stets eine Lösung von 30 gr. Kaliumhydroxyd in 1000 cbcm. Glycerin, eine Mischung, welche ich unter dem Namen Glycerinkalilauge bereits zur Isolirung und Bestimmung der Cellulose in vegetabilischen Substanzen empfohlen habe (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 16, S. 370), und verfuhr folgendermassen:

In ein circa 250 cbcm. fassendes Kölbchen bringt man 10—15 gr. getrocknete und gepulverte Knochen und 75 cbcm. alkalisches Glycerin, erhitzt allmälig unter häufigem Umschütteln bis 200° und erhält auf dieser Temperatur ungefähr eine Stunde lang. Die Einwirkungsdauer hängt im Wesentlichen von der Festigkeit des Knochengewebes und dem Feinheitsgrade des Pulvers ab. Die bis auf 150° erkaltete Masse entleert man in eine Schale, in welcher sich 500 cbcm. siedendes Wasser befinden, rührt um, lässt absitzen und zieht die überstehende Flüssigkeit mit einem mit Leinwand überspannten Heber ab. Letztgenannte Operationen wiederholt man so lange, bis das Waschwasser keine Spur alkalischer Reaction mehr zeigt. Der Rückstand wird auf ein Filter gebracht und bei 100° getrocknet.

Auf diese Weise erhält man ein weisses, bisweilen mit einem Stich ins Gelbliche versehenes Pulver, welches beim Glühen keinerlei Bräunung zeigt und die Struktur der ursprünglichen Knochen getreu wiedergibt; es ist sehr hygroskopisch, knirscht zwischen den Zähnen, wird beim Reiben stark elektrisch, und löst sich mit äusserster Leichtigkeit in Säuren. Ich werde diese Substanz späterhin der Kürze wegen als Glycerinasche bezeichnen.

Nachdem wir gezeigt haben, dass es möglich ist, die Mineralstoffe der Knochen ohne Anwendung von Glühhitze zu isoliren, haben wir den bei Weitem wichtigeren Nachweis zu führen, dass die Glycerinasche die Gesammtheit der in den Knochen enthaltenen Mineralstoffe unverändert zum Ausdruck bringt.

Ein indirecter Beweis dafür kann in der Thatsache erblickt werden, dass künstliches Calciumphosphat seine Zusammensetzung nicht ändert, wenn man es mit Glycerinkalilauge erhitzt. Einen directen Beweis liefert die Analyse der Glycerinasche selbst. Wir beschäftigen uns zunächst mit derjenigen Asche, zu deren Darstellung die früher besprochenen Rinderzähne gedient haben.

Wegen der Hygroskopicität der Substanz wandte ich dieselbe im lufttrockenen Zustande an, bestimmte ihren Wassergehalt, und berechnete die Analysen auf Trockensubstanz.

Zur Bestimmung des hygroskopischen Wassers erhitzte ich eine abgewogene Quantität auf 130° C. Nach vier Stunden trat in der Regel völlige Gewichtsconstanz ein. Erhitzte man die Substanz jedoch noch höher, etwa auf 350°, so ergab sich ein weiterer Gewichtsverlust, welcher, wie leicht gezeigt werden konnte, wiederum durch Entweichen von Wasser bedingt war. Stellt man den Versuch in einem Glasröhrchen an, so erhält man einen wässerigen Beschlag, welcher neutral reagirt. Diese Neutralität verdient hervorgehoben zu werden, da bei wasserhaltigen, fluorreichen Mineralien dem Wasser in der Regel etwas Fluorwasserstoff beigemischt ist. Die Glycerinasche enthält also Wasser, welches bei 130° C. nicht ausgetrieben werden kann und deshalb als chemisch gebunden betrachtet werden muss.

Es könnte sehr zweifelhaft erscheinen, ob dieses Wasser auch im ursprünglichen Knochen vorkommt oder erst im Verlauf der Darstellung aufgenommen worden ist. Demgegenüber muss darauf hingewiesen werden, dass Calciumphosphat, wie schon erwähnt, unter gleichen Bedingungen kein Wasser bindet. Sehr bemerkenswerth ist ferner der Umstand, dass der Stickstoffgehalt der Knochen stets niedriger gefunden wird, als ihrem Gehalt von organischer Substanz entspricht. Leicht erklärlich wird diese Thatsache, wenn neben der eigentlichen Leimsubstanz noch ein anderer, stickstofffreier Stoff vorhanden ist, welcher beim Glühen ebenfalls entweicht und deshalb den Stickstoffgehalt der organischen Substanz herabdrückt.

Auch C. Aeby (23) hat in dem von ihm untersuchten Elfenbein Wasser gefunden. Wenn nun auch zugegeben werden muss, dass seine Beobachtungen nicht ohne Weiteres auf frische Knochen übertragbar sind, so gewinnen sie doch im Verein mit den von uns ermittelten Thatsachen ein erhöhtes Interesse und erheben die Annahme des Vorkommens von gebundenem Wasser im ursprünglichen Knochen zu grosser Wahrscheinlichkeit. — Es dürfte nicht überflüssig sein, bei dieser Gelegenheit auf die Existenz natürlicher wasserhaltiger Phosphate, wie des von Sandberger entdeckten Isoklas ($Ca_4P_2O_9 + 5\,H_2O$), hinzuweisen.

Ich versuchte Anfangs das chemisch gebundene Wasser dadurch zu bestimmen, dass ich die in einem Platintiegel enthaltene Substanz über kleiner Flamme erhitzte, ohne dass der Boden des Tiegels zum Glühen kam. Ich musste mich jedoch bald überzeugen, dass selbst bei dieser relativ niedrigen Temperatur schon Kohlensäure entwich. Diese Beobachtung, welche auch von Aeby (23), Wibel (25) u. A. gemacht worden ist, zeigt, dass die Kohlensäure nicht in der Form von Calcium- oder Magnesiumcarbonat, sondern als Phosphatcarbonat vorhanden ist, welches die Kohlensäure viel leichter verliert, als Calciumcarbonat. Ich führte daher die Wasserbestimmung in der Weise aus, dass ich die in einem Platinschiffchen abgewogene Substanz wie bei der Elementaranalyse in ein schwer schmelzbares Glasrohr brachte, sie im trocknen

Luftstrom zur Rothgluth erhitzte und die entweichenden Wasserdämpfe im gewogenen Chlorcalciumrohr auffing. Ausserdem ermittelte ich stets den Gewichtsverlust, welchen die Substanz beim Erhitzen zur Weissgluth (über dem Gebläse) erlitt. Bei dieser hohen Temperatur entweicht sowohl Kohlensäure als Wasser. Die Identität der hierbei erhaltenen Werthe mit der Summe von Kohlensäure und Wasser war eine Controlle für die Richtigkeit der ausgeführten Bestimmungen.

Ueber das Fluor ist bereits früher das Nöthige gesagt worden. Die Glycerinasche enthält nicht mehr Fluor als die Glühasche; ein Verlust an diesem Element tritt demnach beim Einäschern nicht ein.

Von sonstigen bemerkenswerthen Bestandtheilen waren in der Glycerinasche Chlor, Kali und Natron aufzufinden. — Heintz (17) hat die Anwesenheit des Chlors in den gereinigten Knochen entschieden in Abrede gestellt. Zalesky (20) dagegen hat diesen Stoff als integrirenden Bestandtheil der Knochenasche erkannt. Das Vorkommen von Chlor in der Glycerinasche schliesst jeden Zweifel an der Richtigkeit dieser Anschauung aus.

Die Alkalien sind meines Wissens bisher in der Knochenasche gar nicht gesucht worden. Da wo man sie fand, betrachtete man sie als durch die Ernährungsflüssigkeiten des Knochengewebes bedingte Verunreinigungen. Der constante und keineswegs geringfügige Gehalt der Glycerinasche an Kali und Natron liefert den unzweideutigen Beweis, dass auch diese Basen an der Zusammensetzung der Knochenasche wesentlichen Antheil nehmen.

Das Vorkommen der zuletzt genannten drei Stoffe ist auch in anderer Hinsicht interessant. Wenn Chlor, Kali und Natron der lösenden Wirkung des Glycerins und Wassers widerstehn, so beweist dieser Umstand, dass die Verkettung der einzelnen Bestandtheile des Knochenphosphats eine ungemein feste sein muss; wir haben daher um so weniger zu fürchten, dass die von uns angewandte Extractionsmethode an dem Gleichgewichtszustande des Phosphat-Moleküls irgend etwas Wesentliches ändert.

Die Bestimmung von Chlor, Kali und Natron geschah nach allgemein üblichen Methoden[1]), diejenige von Kalk, Magnesia, Phosphorsäure nach dem früher als No. I bezeichneten Verfahren.

Ich gebe zunächst die Analyse zweier Aschen, welche sich auf dasselbe Material, nämlich die früher benutzten Rinderzähne beziehen, aber zu verschiedenen Zeiten dargestellt worden sind:

	1.	2.
CaO	50,65	50,76
MgO	1,52	1,52
K_2O	0,23	0,20
Na_2O . . .	0.97	1,16
H_2O	2,27	2,21
P_2O_5	38,78	38,88
CO_2	4,16	4,09
Cl	0,05	0,05
Summe . . .	98,66	98,87

Die Uebereinstimmung der beiden Zahlenreihen ist eine so vollkommene, dass wir darin einen erneuten Beweis für die Brauchbarkeit unserer Extractionsmethode erblicken dürfen. — Zu demselben Resultate gelangen wir, wenn wir die Analyse der Glycerinasche mit derjenigen der Glühasche vergleichen. Bringen wir zu diesem Zweck die Glühasche auf denselben Wasser- und Kohlensäure-Gehalt, so ergibt sich Folgendes:

	Glycerinasche.		Glühasche.
	1.	2.	
CaO	50,68	50,76	50,59
MgO	1,52	1,52	1,47
K_2O	0,23	0,20	0,24
Na_2O	0,97	1,16	1,07
H_2O	2,27	2,21	2,21
P_2O_5	38,78	38,88	39,13
CO_2	4,16	4,09	4,09
Cl	0,05	0,05	0,09
Summe	98,66	98,87	98,89

[1]) Bei der Alkalienbestimmung wurde die Anwendung von Glasgefässen fast vollständig vermieden.

Von den vorkommenden Differenzen sind nur diejenigen, welche den Kalk- und Phosphorsäuregehalt betreffen, so gross, dass sie nicht ohne Weiteres mit Stillschweigen übergangen werden dürfen. Aber selbst, wenn man zugeben wollte, dass an ihrem Zustandekommen keine Analysenfehler mitgewirkt haben, halten sie sich doch in so engen Grenzen, dass sie die auf die Analyse der Glycerinasche sich stützenden Schlussfolgerungen nicht zu alteriren vermögen.

Im Uebrigen gelangen wir wiederum zu einem 1,23 % betragenden Deficit, dessen Höhe uns ebenso wie früher zwingt, einen bisher nicht bestimmten Stoff in der Knochenasche anzunehmen.

III.

Analysen einiger durch Extraction mit alkalischem Glycerin hergestellter Knochen- und Zahn-Aschen.

Wie schon Eingangs hervorgehoben wurde, entsprach es keineswegs dem Zweck dieser Arbeit, eine möglichst grosse Anzahl von Analysen auszuführen, vielmehr verschaffte ich mir zur Beurtheilung der bei der bisherigen Untersuchung der Glycerinasche gemachten Beobachtungen nur soviel analytisches Material, als nothwendig war, um alle Zufälligkeiten mit Sicherheit auszuschliessen. Ich habe daher in der früher beschriebenen Art und Weise noch Menschen-, Rinder- und Gänseknochen extrahirt und deren Asche analysirt. Ausserdem fand ich in der Glycerin-Extractions-Methode ein ausgezeichnetes Mittel, den Schmelz der Zähne quantitativ vom Zahnbein zu trennen. Bekanntlich hat die Schwierigkeit dieser Operation es mit sich gebracht, dass die Schmelz-Analysen ihrer Zahl nach recht beschränkt und die darin vorkommenden Schwankungen so gross sind, dass es uns schwer fällt, bestimmte Schlüsse daraus zu ziehen. Ich verfuhr in der Art, dass ich zunächst ganze Rinderzähne — von anderer Provenienz als die früher benutzten — mit Glycerinkalilauge erhitzte. Die Extraction der organischen Substanz war hierbei nur eine unvollkommene, genügte aber, um den Zusammenhang beider Gewebsarten derart zu lockern, dass sie sich entweder selbstthätig von einander ablösten oder vermittelst

eines Messers leicht und quantitativ von einander getrennt werden konnten. Nach vollzogener Trennung wurde sowohl Schmelz wie Zahnbein gemahlen und von den letzten Resten organischer Substanz befreit.

Die qualitative Prüfung der aus vorgenannten Substanzen dargestellten Glycerinaschen bestätigte bis in alle Einzelheiten die Erfahrungen, welche wir bereits mit der zuerst besprochenen Zahnasche gemacht haben. Ueber die Resultate der quantitativen Bestimmungen geben folgende Zahlen Auskunft, welche stets das Mittel von mindestens zwei gut übereinstimmenden Analysen sind:

	Rinderzähne A.	Rinderzähne B.		Menschenknochen [1]).	Rinderknochen [2]).	Gänseknochen [3]).
		Zahnschmelz.	Zahnbein.			
CaO . . .	50,76	51,98	50,36	51,31	51,28	51,01
MgO . . .	1,52	0,53	1,83	0,77	1,05	1,27
K_2O . . .	0,20	0,20	0,14	0,32	0,18	0,19
Na_2O . .	1,16	1,10	0,80	1,04	1,09	1,11
H_2O . . .	2,21	1.80	2,90	2,46	2,33	3,05
P_2O_5 . .	38,88	39,70	38,60	36,65	37,46	38,19
CO_2 . . .	4,09	3,23	3,97	5,86	5,06	4,11
Cl	0,05	0,21	0,03	0,01	0,04	0,06
Summe [4])	98,87	98,75	98,63	98,43	98,49	98,99

Trotz der Verschiedenheit in der Herkunft der untersuchten Aschen bietet ihre Zusammensetzung ein sehr einheitliches Bild. Fassen wir zunächst die vier Hauptbestandtheile der Knochen, Kalk, Magnesia, Phosphorsäure und Kohlensäure ins Auge, so weisen deren Quantitäten nur unerhebliche Schwankungen auf; dieselben verlaufen ausserdem keineswegs regellos, sondern folgen einer bestimmten Gesetzmässigkeit, auf welche, obgleich sie sehr in die Augen springt, meines

[1]) Oberarmknochen.

[2]) Schenkelknochen.

[3]) Sämmtliche Knochen eines Thieres.

[4]) Streng genommen müsste bei allen Analysen eine dem Chlorgehalt äquivalente Sauerstoff-Quantität in Abzug gebracht werden; ich habe diese Correctur nicht ausgeführt, weil sie bei der Geringfügigkeit der Chlormenge bedeutungslos ist.

Wissens noch nicht hingewiesen worden ist. Kalk und Magnesia einerseits, Phosphorsäure und Kohlensäure andererseits stehen nämlich in einem gewissen Compensationsverhältniss zu einander. Je höher der Kalk-, bezw. Phosphorsäure-Gehalt, um so geringer der Magnesia-, bezw. Kohlensäure-Gehalt. Beide Basen und beide Säuren ergänzen sich zu einer constanten Grösse. So finden wir in den Menschenknochen die grösste Menge Kohlensäure, gleichzeitig aber auch die geringste Menge Phosphorsäure. Ebenso ist im Zahnbein mit dem höchsten Magnesiagehalt der niedrigste Kalkgehalt verbunden. Summiren wir daher Kalk und Magnesia auf der einen, Phosphorsäure und Kohlensäure auf der anderen Seite, so

	Rinderzähne A.	Rinderzähne B.		Menschenknochen.	Rinderknochen.	Gänseknochen.
		Zahnschmelz.	Zahnbein.			
CaO . . .	50,76	51,98	50,36	51,31	51,28	51,01
MgO . . .	1,52	0,53	1,83	0,77	1,05	1,27
Summe .	52,28	52,51	52,19	52,08	52,33	52,28
P_2O_5 . . .	38,88	39,70	38,60	36,60	37,46	38,19
CO_2 . . .	4,09	3,23	3,97	5,86	5,06	4,11
Summe .	42,97	42,93	42,57	42,51	42,52	42,40

verschwinden die Schwankungen oder reduciren sich doch auf ein so geringes Maass, dass wir wohl berechtigt sind, in gewissem Sinne von einer Constanz des Verhältnisses der in den Knochen vorkommenden Mineralstoffe zu sprechen.

Als weiteren instructiven Beleg für die Allgemeingültigkeit vorstehender Regel führe ich die Analysen von E. Wildt (22) an. Dieselben beziehen sich auf Knochenaschen von Kaninchen, deren Alter zwischen einem Tage (bei 1) und vier Jahren (bei 12) schwankt:

	1.	2.	3.	4.	5	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
CaO	52,17	52,16	52,10	51,91	52,10	52,49	52,60	52,63	52,78	52,62	52,76	52,89
MgO	1,38	1,36	1,26	1,22	1,09	1,01	1,02	1,05	0,93	0,91	0,93	0,83
Summe . . .	53,55	53,52	53,36	53,13	53,19	53,50	53,62	53,69	53,71	53,52	53,69	53,67
P_2O_5	42,05	42,13	42,19	42,20	41,64	41,03	40,80	40,80	40,05	40,04	39,78	39,80
CO_2	3,65	3,84	3,99	4,00	4,52	4,69	4,92	4,94	5,54	5,71	5,81	5,66
Summe . . .	45,70	45,97	46,18	46,20	46,16	45,72	45,72	45,74	45,59	45,75	45.59	45,46

Obgleich mit zunehmendem Alter der Thiere der Kalkgehalt der Knochenasche nur eine geringe Steigerung erfährt, ist doch der Parallelismus im Wachsen des Kalkgehalts und Sinken des Magnesiagehalts unverkennbar. Dieselben Verhältnisse finden wir bei der Phosphorsäure und Kohlensäure wieder, nur ist die Compensation beider Stoffe noch viel auffälliger, weil die Schwankungen an sich grösser sind.

Eine gesonderte Betrachtung verdienen Schmelz und Zahnbein. Der Hauptunterschied beider Stoffe besteht darin, dass beim Schmelz eine auffällige geringe, beim Zahnbein eine auffällig grosse Menge Kalk durch Magnesia ersetzt ist. Der Kohlensäuregehalt ist gering, wie denn überhaupt die Zähne weniger Kohlensäure enthalten, als die Knochen.

Die Alkalien kommen etwa in derselben Menge wie die Magnesia vor, und zwar ist das Natron immer bei Weitem überwiegend.

Ueber das Fluor ist bereits früher gesprochen worden; hier nehmen die Rinderzähne insofern eine Ausnahmsstellung ein, als ihr Fluorgehalt möglicherweise 0,1 % erreichen kann.

Die Quantität des Chlors ist stets sehr gering, insbesondere erreicht der Chlorgehalt der Menschenknochen einen ganz minimalen Werth. Die einzige Ausnahme bildet der Schmelz, und es muss gerade ein relativ sehr hoher Chlorgehalt als ein Hauptcharakteristikum desselben betrachtet werden. — Auch F. Hoppe-Seyler (18) hat bei seinen Untersuchungen über die Constitution des Zahnschmelzes Chlor als wesentlichen Bestandtheil und zwar in Mengen von 0,3—0,5 % gefunden.

Was schliesslich das Wasser betrifft, so schwankt dessen Menge zwischen 2—3 %, ohne eine bestimmte Regelmässigkeit erkennen zu lassen. Eine solche haben wir allerdings auch kaum zu erwarten; denn wenn auch alle Anzeichen dafür sprechen, dass die ursprünglichen Knochen chemisch gebundenes Wasser enthalten, so müssen wir doch die Möglichkeit zugeben, dass die Menge desselben in obigen Zahlen

nicht immer mit derjenigen Genauigkeit zum Ausdruck kommt, auf welche die übrigen Werthe Anspruch machen können.

Wir sind nun auf Grund des gesammelten analytischen Materials in der Lage, uns darüber zu vergewissern, ob die in den Knochen vorhandenen Basen gerade hinreichend sind, die Summe der Säuren zu sättigen, d. h. ob die Mineralstoffe der Knochen nur aus Neutralsalzen bestehen, oder ob sich auf der einen oder anderen Seite ein Ueberschuss ergibt, welcher auf die Anwesenheit eines sauren oder basischen Salzes schliessen lässt.

Bei der Wichtigkeit des Gegenstandes ist derselbe vielfach erörtert worden. — Berzelius (8) hat darüber folgenden Versuch angestellt: Von zwei gleichen Theilen Knochenpulver benutzte er einen zur Bestimmung der Kohlensäure, den anderen veraschte er, löste die Asche in Salzsäure, fällte mit Ammoniak und bestimmte im Filtrat den Kalk durch Kaliumcarbonat. Er erhielt einen Niederschlag von Calciumcarbonat, dessen Menge der ermittelten Kohlensäure äquivalent war. Daraus schliesst Berzelius, dass die Zusammensetzung des Calciumphosphats der Knochen dieselbe ist, wie die des Ammoniakniederschlags. Da nun nach Berzelius' Analysen aus Lösungen, welche überschüssigen Kalk enthalten, Natriumphosphat einen Niederschlag fällt, welcher auf 3 Aeq. P_2O_5 8 Aeq. CaO (statt 9 im normalen Phosphat) enthält, so schreibt Berzelius auch dem Knochenphosphat diese Zusammensetzung zu, betrachtet es also als ein saures Salz. Rammelsberg (35) hat aber nachgewiesen, dass aus einer Lösung, welche mehr Kalk enthält, als der zugehörigen Phosphorsäure entspricht, ein Niederschlag fällt, dessen Zusammensetzung zwar nicht ganz constant ist, sich aber der Formel des normalen Phosphats ($P_2O_5 . 3\,CaO$) nähert. Aus unseren eigenen Untersuchungen geht, wie später gezeigt werden wird (s. S. 292), unzweifelhaft hervor, dass der aus der salzsauren Lösung der Knochenasche mit Ammoniak fallende Niederschlag basischer Natur ist. Berzelius' Schluss gründet sich also auf eine falsche Voraussetzung; sein Versuch spricht viel eher

für die Anwesenheit eines neutralen oder basischen, als eines sauren Phosphats.

Andere Chemiker wie Marchand (12), Boussingault (36), v. Bibra (15) betrachten das Knochenphosphat als dreibasisch phosphorsauren Kalk, ohne ihre Ansicht durch directe und entscheidende Versuche zu rechtfertigen.

Heintz (17) betrachtete es als Hauptaufgabe seiner Untersuchungen, hierüber Klarheit zu schaffen, und in der That sind seine Analysen viel besser dazu geeignet, als alle früheren. Sie stimmen sämmtlich darin überein, dass sich ein Ueberschuss von Basis herausstellt, welcher, auf Kalk berechnet, etwa 2 % ausmacht. Da aber Heintz, dem Zuge der Zeit folgend, grössere Fluormengen in den Knochen annahm und durch eine vereinzelte, schon früher kritisirte, Fluorbestimmung in seiner vorgefassten Meinung noch bestärkt wurde, so liess er sich zu dem Fehlschluss verleiten, dass der überschüssige Kalk durch Fluorwasserstoff gesättigt werde und dass wir es in den Knochen nur mit Neutralsalzen zu thun hätten.

Obgleich Zalesky (20) nachgewiesen hat, dass der Fluorgehalt der Knochen nicht entfernt die von Berzelius und Heintz angegebene Höhe erreicht, hat er es doch unterlassen, die Heintz'sche Ansicht zu berichtigen; er spricht sich über diesen Punkt überhaupt nicht direct aus.

Kühne (37) weist darauf hin, dass ein den Stoffwechsel der Knochen ermöglichender Vorgang nur gedacht werden könne, wenn man das normale Calciumphosphat als blosse Durchgangsstufe eines basischen Salzes betrachte, welches zweifellos den überwiegenden Bestandtheil der Knochen bilde.

v. Recklinghausen (38) dagegen findet bei der Untersuchung junger Menschenknochen mehr Phosphorsäure, als zur Bildung von Tricalciumphosphat nöthig ist.

In ganz ähnlicher Weise wie Heintz operirt E. Wildt (22). Er findet in seinen zahlreichen und sehr genauen Analysen von Kaninchenknochen stets überschüssige Basis. Da er jedoch auf Grund des analytischen Deficits 1 % Fluor und

darüber berechnet, so gelangt er nicht nur zur Annahme eines neutralen Phosphats, sondern spricht sich, wie Berzelius, für die gleichzeitige Anwesenheit eines sauren Salzes ($CaHPO_4$) aus. Er geht sogar soweit, die Menge des Letzteren aus dem Aequivalentverhältniss zwischen Kalk und Phosphorsäure zu berechnen.

Seinem Beispiele sind später M. Schrodt (27) und E. Hiller (28) gefolgt.

Wildt sowohl wie Heintz verkennen die wahre Sachlage, weil sie einen Faktor in ihre Berechnungen einführen, welcher in Wirklichkeit gar nicht existirt. Ausserdem muss darauf hingewiesen werden, dass Wildt ebenso wie alle übrigen Analytiker die Alkalien nicht bestimmte, indem er sich für berechtigt hielt, die mit Wasser extrahirte Knochenasche als alkalifrei zu betrachten.

Im Gegensatz zu den meisten der bisher genannten Forscher hält C. Aeby (23) das Knochenphosphat für ein basisches, etwa der Formel $3\ Ca_3(PO_4)_2$, CaO entsprechend. Nur der Zahnschmelz soll Tricalciumphosphat enthalten. Aeby hat seine Ansichten weniger auf Analysen, als auf Betrachtungen über die Metamorphose der Knochen gegründet. Die Neigung der fossilen Knochen, Fluor aufzunehmen, erklärt sich seiner Meinung nach daraus, dass der überschüssige Kalk sich allmälig mit Fluorwasserstoff sättigt. Beim Schmelz, welcher nur neutrales Phosphat enthält, kann eine solche Anreicherung mit Fluor nicht stattfinden; dagegen setzt sich derselbe mit dem gelösten Eisencarbonat der natürlichen Wässer zu Eisenphosphat (Vivianit) um, und färbt sich infolgedessen häufig intensiv blau.

Die Litteratur verzeichnet also alle Ansichten, welche überhaupt denkbar sind, ohne dass wir der einen oder anderen eine höhere Wahrscheinlichkeit zusprechen können.

Um mir ein anschauliches Bild über die Vertheilung von Säuren und Basen in den von mir analysirten Knochen und Zähnen zu verschaffen, habe ich die in der früher mitgetheilten Tabelle enthaltenen Procentzahlen durch das Aequivalentgewicht des betreffenden Stoffes dividirt und auf diese Weise

Werthe erhalten, welche die relative Anzahl der vorhandenen Aequivalente angeben:

Aequivalente.	Rinderzähne A.	Rinderzähne B. Zahnschmelz.	Rinderzähne B. Zahnbein.	Menschenknochen.	Rinderknochen.	Gänseknochen.
CaO	1,8128	1,8564	1,7986	1,8328	1,8314	1,8218
MgO	0,0760	0,0265	0,0917	0,0385	0,0525	0,0635
K_2O	0,0045	0,0043	0,0030	0,0068	0,0038	0,0040
Na_2O	0,0374	0,0355	0,0258	0,0335	0,0352	0,0358
Basische Aequivalente	1,9307	1,9227	1,9189	1,9116	1,9229	1,9251
P_2O_5	1,6428	1,6775	1,6308	1,5385	1,5828	1,6136
CO_2	0,1859	0,1468	0,1805	0,2664	0,2355	0,1868
Cl	0,0015	0,0059	0,0009	0,0003	0,0011	0,0017
Saure Aequivalente .	1,8302	1,8302	1,8122	1,8152	1,8139	1,8021
Basischer Ueberschuss	0,1005	0,0925	0,1067	0,0964	0,1090	0,1230

Das Wasser musste hierbei als Neutralkörper behandelt und ausser Rechnung gestellt werden; nach der Temperatur zu urtheilen, bei welcher es entweicht, besitzt es etwa die Funktionen des Krystallwassers.

Das Fluor habe ich unberücksichtigt gelassen, da es seiner äusserst geringen Menge wegen das Gesammtbild doch nicht zu beeinflussen vermag.

Würden in den Knochen nur Neutralsalze vorkommen, so müsste die Summe der basischen Aequivalente gleich derjenigen der sauren sein. Führen wir die betreffenden Additionen aus, so beobachten wir, dass sich Säuren und Basen nicht das Gleichgewicht halten, sondern dass sich ein Ueberschuss von Basis ergibt. Bei der Einheitlichkeit in der Zusammensetzung der verschiedenen Aschen fällt auch die Höhe dieses basischen Ueberschusses recht gleichmässig aus. Auf Kalk berechnet würde derselbe etwa 2,8 % betragen. Nehmen wir aus vorstehenden Zahlen die Mittelwerthe, so gelangen wir zu folgender Bilanz:

1,9220 basische Aequivalente,
1,8173 saure Aequivalente,

0,1047 basischer Ueberschuss.

Aus derselben ergibt sich, dass in den Knochen ungefähr auf 19 Aequivalente Basis 18 Aequivalente Säure kommen. Natürlich können diese Zahlen nur als Annäherungswerthe Bedeutung beanspruchen.

Jedenfalls geht aus den soeben angestellten Betrachtungen mit Sicherheit hervor, dass die in den Knochen vorhandenen Säuren nicht ganz hinreichen, um die Summe der Basen zu sättigen, wenn auch der hierdurch bedingte Grad der Basicität ein sehr schwacher ist. Dieser Thatbestand lässt zwei Möglichkeiten zu: Entweder enthalten die Knochen nur ein einziges sehr schwach basisches Phosphat, oder es liegt ein Gemisch, bezw. eine lose Verbindung von neutralem und basischen Phosphat vor.

Ich hielt die letztere Eventualität von vornherein für die wahrscheinlichere. Es war mir deshalb interessant, das Verhalten der Glycerinasche gegen eine neutrale Lösung von Ammoniumcitrat kennen zu lernen. Bekanntlich sind die wasserhaltigen sauren und basischen Calciumphosphate «citratlöslich», während das Tricalciumphosphat der Petermann'schen Lösung widersteht.

Qualitative Versuche ergaben, dass sämmtliche Glycerinaschen zu einem erheblichen Theile in Lösung gingen, wenn man sie bei 50° C. mit neutraler Ammoniumcitratlösung behandelte. Bei der Glycerinasche der Rinderzähne (A) habe ich den Grad der Löslichkeit quantitativ bestimmt und folgende Resultate erhalten:

	CaO. %.	MgO. %.	P_2O_5. %.
Gesammtgehalt	50,76	1,52	38,88
Citratlöslich nach 15 Minuten langer Einwirkung bei 50° C.	18,70	1,00	14,43
Citratlöslich nach 30 Minuten langer Einwirkung bei 50° C.	29,04	1,52	22,28
Citratlöslich nach 90 Minuten langer Einwirkung bei 50° C.	29,29	1,52	22,69

Schon nach einer halben Stunde ist alles Lösliche in Lösung übergegangen; eine Verdreifachung der Einwirkungs-

dauer erhöht die Menge des löslichen Antheils nur ganz unwesentlich. Demnach haben wir die nach halbstündiger Einwirkung erhaltenen Werthe als Maximalzahlen aufzufassen. Ein Blick auf dieselben lehrt, dass die reichliche Hälfte des Knochenphosphats citratlöslich ist. Die Mineralstoffe der Knochen lassen sich also durch eine neutrale Lösung von Ammoniumcitrat in zwei ungleichartige Theile zerlegen, ein Verhalten, welches im Einklang mit der oben ausgesprochenen Anschauung steht, dass das Knochenphosphat ein Gemisch oder eine lose Verbindung eines neutralen und basischen Phosphates ist. Da die Magnesia vollkommen citratlöslich ist, so gehört sie wahrscheinlich nur dem basischen Phosphat an. — Ich komme auf diese Versuche noch einmal zurück.

Die Citratlöslichkeit der in den Knochen enthaltenen Phosphorsäure spricht übrigens in Uebereinstimmung mit den Ansichten von Holdefleiss und Marek und entgegen denjenigen von Wagner entschieden dafür, dass dem Knochenmehl eine sehr beachtenswerthe Bedeutung als Düngemittel zukommt.

IV.

Ueber die Ursache des bei der Analyse der Knochenasche auftretenden Deficits.

Wir haben bei unsern Betrachtungen über das in den Mineralstoffen der Knochen herrschende Verhältniss von Basen zu Säuren bisher ein wichtiges Moment ausser Acht gelassen, welches für diese Frage von entscheidender Bedeutung ist. Wie nämlich bei der Analyse der aus Rinderzähnen stammenden Glycerinasche, so hat sich bei allen übrigen Analysen das oft erwähnte Deficit eingestellt. Das constante Auftreten desselben sowie seine ansehnliche Höhe schliessen jeden Zweifel darüber aus, dass dasselbe nur zum allerkleinsten Theil durch Analysenfehler bedingt sein kann und dass es der Hauptsache nach auf Rechnung eines besonderen, bisher nicht bestimmten Körpers zu setzen ist. So lange wir über die Natur des Letzteren nicht im Klaren sind, können wir ein abschliessendes und endgültiges Urtheil über die Vertheilung von Säuren und

Basen in den Knochen nicht fällen, vielmehr müssen unsere früher entwickelten Ansichten über die Basicität der Knochenasche als vorläufige gelten, welche entsprechend zu modificiren sind, je nachdem sich der das Deficit bedingende Stoff als Neutralkörper, Säure oder Basis entpuppt.

Aus unsern bisherigen Beobachtungen geht nur soviel hervor, dass der zu suchende Stoff glühbeständig ist oder wenigstens in Form einer glühbeständigen Verbindung vorkommt, dass er durch die bei der Analyse der Knochenasche angewandten Reagentien nicht gefällt wird und dass er keine flüchtige Säure ist, welche durch Salzsäure oder Salpetersäure frei gemacht werden kann. Indem ich mir diese Anhaltspunkte zu Nutze machte, suchte ich mir ein für die qualitative Prüfung geeignetes Material in folgender Art zu verschaffen:

Je 25 gr. Glycerinasche wurden in wenig überschüssiger Salzsäure gelöst und aus der verdünnten Lösung Kalk, Magnesia und Phosphorsäure genau so gefällt, wie bei der quantitativen Bestimmung. Da jeder grössere Ueberschuss der Fällungsmittel für die spätere qualitative Analyse ein lästiger Ballast gewesen wäre, so ging ich nur wenig über die theoretisch nothwendige Menge hinaus, was durch Abwägen, bzw. Abmessen der betreffenden Reagentien leicht zu erreichen war. Das ammoniakalische Filtrat vom Magnesiumammoniumphosphat-Niederschlag wurde in geräumigen Platinschalen eingedampft, bei 130° C. getrocknet, und durch Glühen die Ammonsalze verjagt. Die auf diese Weise von ihren Hauptbestandtheilen befreite Glycerinasche musste neben Alkalien und dem geringen Ueberschuss der zugesetzten Magnesia den gesuchten Fremdkörper enthalten.

Ich habe daher diesen Rückstand einer eingehenden und nach den verschiedensten Richtungen ausgedehnten qualitativen Prüfung unterzogen. Das Resultat derselben war jedoch ein vollständig negatives. Ausser Magnesia, Kali, Natron und Chlor war nichts zu entdecken.

Besondere Aufmerksamkeit widmete ich dem etwaigen Vorkommen von Kieselfluorwasserstoffsäure oder Borsäure. — Ueber erstgenannte Substanz habe ich mich bereits gelegent-

lich der Besprechung des Fluors geäussert. Die zuletzt genannte Säure ist in neuerer Zeit in vielen Vegetabilien nachgewiesen worden. Zuletzt hat Deltour (34) auf den relativ hohen Borsäuregehalt der fleischigen Früchte, des Hopfens u. s. w. aufmerksam gemacht; er hat auch verschiedene Thierknochen in den Bereich seiner Untersuchungen gezogen und constatirt, dass dieselben borsäurefrei sind. — Ich habe nach demselben Verfahren gearbeitet, wie Deltour, nämlich nach der von Rosenbladt und gleichzeitig von Gooch angegebenen Methode, welche auf der Ueberführung der Borsäure in den flüchtigen Borsäure-Methyläther beruht. Ich konnte jedoch ebenfalls keine Spur Borsäure auffinden.

Da die soeben geschilderten directen Versuche zur Auffindung eines Fremdkörpers nicht den gewünschten Erfolg hatten, suchte ich auf einem indirecten Wege zum Ziel zu gelangen. — Zunächst bemühte ich mich zu ermitteln, ob der aus einer salzsauren Lösung der Knochenasche mit Ammoniak fallende Niederschlag bei seiner Analyse ebenfalls ein Deficit aufweist, welches auf die Anwesenheit eines fremden Stoffes schliessen lässt. Zur Darstellung des Ammoniakniederschlages diente die Glycerinasche des Zahnbeins. Dieselbe wurde in wenig überschüssiger Salzsäure gelöst, die Lösung stark verdünnt, zum Kochen erhitzt und mit Ammoniak gefällt. Der Niederschlag wurde heiss filtrirt, mit siedendem Wasser erschöpfend ausgewaschen, bei 100° C. getrocknet, gepulvert und in genau derselben Weise analysirt wie die ursprüngliche Asche. Die Analyse führte zu nachstehenden Zahlen:

	%.
CaO	51,04
MgO	1,57
H_2O	4,99
P_2O_5 . . .	40,91
Cl	0,03
Summe . . .	98,54

Berechnet man die gefundenen Procentzahlen auf Aequivalente, so ergibt sich folgende Zusammenstellung:

CaO . . .	1,8214	Aequivalente,
MgO . . .	0,0785	»
Summe . .	1,8999	basische Aequivalente.
P_2O_5 . . .	1,7286	Aequivalente,
Cl	0,0009	»
Summe . .	1,7296	saure Aequivalente.
	0,1704	basischer Ueberschuss.

Der Ammoniakniederschlag zeigt in seiner Zusammensetzung grosse Aehnlichkeit mit der Asche, aus welcher er bereitet worden ist. Er stellt ein krystallwasserhaltiges, basisches (s. S. 264 u. 284) Phosphat dar, welches eine minimale Menge Chlor in Form einer nicht auswaschbaren Verbindung enthält. Obgleich neben den obengenannten Stoffen kein andrer vorhanden ist, gelangen wir doch wieder zu dem oft besprochenen Deficit. Dass an dem Zustandekommen desselben die unvermeidlichen Analysenfehler nur in geringem Maasse betheiligt sein können, geht schon daraus hervor, dass mit der Vereinfachung der Analyse keineswegs eine Verringerung in der Höhe des Fehlbetrages parallel geht. Wir müssen Letzteren daher wiederum als Indicator eines neuen Knochenbestandtheils betrachten.

Der besprochene Versuch bietet zwar für die Annahme eines Fremdkörpers in den Knochen eine neue Stütze, lässt aber die Natur desselben nur um so räthselhafter erscheinen. Während die Zusammensetzung des Ammoniakniederschlages darauf schliessen lässt, dass der gesuchte Stoff durch Ammoniak gefällt wird, mussten wir auf Grund der Erfahrungen, welche wir bei der gewöhnlichen Analyse der ursprünglichen Knochenasche machten, das Gegentheil annehmen.

Zur Aufklärung dieses Widerspruchs beschloss ich, den Versuch mit einem einfachen, künstlichen, nicht aus Knochen stammenden Calciumphosphat zu wiederholen. Reinster isländischer Doppelspath, dessen Zusammensetzung genau der Formel $CaCO_3$ entsprach, wurde in wenig überschüssiger Salz-

säure gelöst, die Lösung stark verdünnt, mit einer zur Bildung von Tricalciumphosphat mehr als ausreichenden Menge Natriumphosphat versetzt, zum Kochen erhitzt und mit Ammoniak gefällt. Die weitere Behandlung des Niederschlages war die gleiche wie vorher. Die Analyse lieferte folgende Zahlen:

	%.	Aequivalente.
Ca O	52,76	1,8843
H_2O	4,23	0,4700
P_2O_5	41,66	1,7603
Cl	0,03	0,0009
Summe . , . .	98,68	0,1231 basischer Ueberschuss.

Obgleich das Calciumphosphat bei Gegenwart überschüssiger Phosphorsäure gefällt worden ist, besitzt es doch basischen Charakter (s. S. 264 u. 284); es enthält, wie der Ammoniakniederschlag, Krystallwasser und etwas Chlor, ist in einer neutralen Lösung von Ammoniumcitrat theilweise löslich und weist, obwohl es seiner Abstammung nach mit Knochen nichts gemein hat, doch in seiner Zusammensetzung mit dem Typus der in den Knochen vorkommenden Mineralstoffe eine unverkennbare Aehnlichkeit auf. Das Merkwürdigste aber ist, dass sich diese Aehnlichkeit auch auf das Auftreten des Deficits erstreckt. Dieser Versuch muss als das experimentum crucis angesprochen werden. Ich war mir bewusst, bei der Darstellung des Calciumphosphats nur Kalk, Phosphorsäure, Wasser, Salzsäure, Natron, Kohlensäure angewandt zu haben. Von diesen Substanzen enthielt der Niederschlag nur die ersten vier. An der Richtigkeit und Genauigkeit der Bestimmung des Kalks, der Phosphorsäure und des Chlors war nicht im Geringsten zu zweifeln. Dagegen hielt ich die Möglichkeit nicht für ausgeschlossen, dass ein Theil des Wassers auch bei starkem und anhaltendem Erhitzen nicht entweicht und sich dadurch der Bestimmung entzieht. So befremdlich diese Ansicht zunächst klingt, wird sie doch verständlich, wenn man folgendes erwägt: Wir haben es mit einem basischen Calciumphosphat zu thun, welches wir betrachten können als

Calciumhydroxyd, dessen Hydroxyl-Wasserstoff nicht vollkommen durch das Phosphorsäure-Radical ersetzt ist. Wenn man nun auch nach Analogie ähnlicher Fälle erwarten sollte, dass der nicht substituirte Wasserstoff sich beim Erhitzen in der Form von Wasser abspaltet, so ist doch der Fall denkbar, dass es wasserstoffhaltige basische Salze gibt, welche vollkommen glühbeständig sind und sich so verhalten, wie Kaliumhydroxyd, welches auch in der stärksten Hitze kein Wasser verliert. Ist unsere Anschauung richtig, so muss sich der der Hitze widerstehende Wasserstoff auf chemischem Wege eliminiren lassen, wenn man das basische Salz mit einem feuerbeständigen Säure-Anhydrid, z. B. Kieselsäure, erhitzt, gerade so wie Kaliumhydroxyd beim Schmelzen mit Kieselsäure Wasser abspaltet:

$$2\,KOH + SiO_2 = K_2SiO_3 + H_2O.$$

Von diesen Erwägungen geleitet, operirte ich folgendermassen: Eine gewogene Menge Calciumphosphat, im Betrage von etwa 1—1,3 gr. wurde zunächst über dem Gebläse bis zur Gewichtsconstanz erhitzt; hierauf wurde circa 0,6 gr. reinste, aus Natriumsilicat durch Fällung mit Salzsäure dargestellte und durch Erhitzen zur Weissgluth wasserfrei gemachte Kieselsäure zugewogen, mit einem Glasstäbchen gemischt und abermals in die Flamme des Gebläses gebracht. Würde das Calciumphosphat bereits nach dem Erhitzen für sich frei von Wasser, bzw. Wasserstoff sein, so dürfte beim nachherigen Glühen mit Kieselsäure keine Veränderung eintreten, denn ein Entweichen von Phosphorsäure in Form von Phosphorpentoxyd findet, wie ich mich überzeugt habe, bei Abwesenheit von organischer Substanz nicht statt. Thatsächlich wurde aber ein weiterer Gewichtsverlust beobachtet, welcher nach ungefähr 25 Minuten seinen Maximalwerth erreichte und ganz constant 1,09 % des ursprünglichen Salzes betrug. Das Calciumphosphat enthält demnach eine flüchtige Substanz in Form einer nicht flüchtigen Verbindung, aus welcher sie durch Glühen mit einer feuerbeständigen Säure abgespalten wird; diese Substanz kann nach Lage der Dinge nichts Anderes sein, als Wasser, dessen Vorhandensein durch die Basicität des Salzes be-

dingt wird und welches deshalb im Gegensatz zum Krystallwasser als Constitutions- oder Säure-Wasser zu bezeichnen ist.

Ein vollkommenes Analogon dieses Falles ist mir nicht bekannt. Dagegen liegen die Verhältnisse bei manchen wasserstoffhaltigen, natürlichen Silicaten insofern ähnlich, als dieselben erst bei sehr hoher Temperatur Wasser abspalten. So galt z. B. der Euklas lange Zeit für wasserfrei; selbst gewiegten Analytikern wie Berzelius war der Wassergehalt des Minerals entgangen. Damour hat jedoch gezeigt, dass der Euklas bei starkem und anhaltendem Erhitzen einen Gewichtsverlust von nicht weniger als 6 % erleidet.

Wenn wir die für das Calciumphosphat gegebenen analytischen Daten durch das neu aufgefundene Wasser vervollständigen, so erhalten wir folgende Uebersicht:

	%.	Aequivalente.	
CaO	52,76	1,8843	
H_2O (Krystallwasser) . . .	4,23	0.4700	
P_2O_5	41,66	1,7603	1,8823
Cl	0,03	0,0009	
H_2O (Constitutionswasser). .	1,09	0,1211	
Summe	99,77		

Aus derselben geht hervor, dass die Menge des durch Kieselsäure abspaltbaren Körpers hinreicht, das Deficit zu decken; dass sie ferner dem Ueberschuss der Basis genau äquivalent ist und deshalb als ein Ausdruck der Basicität des Salzes gelten muss. Alle diese Thatsachen stehen mit unserer früher entwickelten Anschauung im vollsten Einklang und liefern für die Richtigkeit derselben einen vollgiltigen Beweis.

Zusammensetzung und Eigenschaften des von uns analysirten Salzes finden, wenn man von dem geringen Chlorgehalt absieht, ihren einfachsten Ausdruck in der Formel $(Ca_3(PO_4)_2 + Ca_5HP_3O_{13} + 2H_2O)$; dieselbe verlangt:

52,83 % CaO,
4,25 % Krystallwasser,
41,86 % P_2O_5,
1,06 % Constitutionswasser.

100,00 %.

Die von der Theorie geforderten Werthe stimmen mit den thatsächlich erhaltenen so genau überein, dass wir die Constitution des Calciumphosphats als erklärt betrachten können. Das einfache Molekularverhältniss zwischen neutralem und basischem Phosphat macht es sehr wahrscheinlich, dass nicht ein Gemenge, sondern eine lose Verbindung beider vorliegt, welche durch eine neutrale Lösung von Ammoniumcitrat in der Weise zersetzt wird, dass das basische Salz in Lösung geht, während das neutrale zurückbleibt.

Das detaillirte Eingehen auf die qualitativen und quantitativen Verhältnisse des Phosphat-Niederschlages wird nicht ungerechtfertigt erscheinen, wenn wir uns vergegenwärtigen, dass derselbe den typischen Charakter der in den Knochen vorkommenden Mineralstoffe besitzt. Mit der Ermittelung der Constitution des Calciumphosphats haben wir gleichzeitig den Schlüssel für das räthselhafte Verhalten der Knochenasche gefunden. Es war von vornherein zu erwarten, dass sich das bei der Analyse der Knochenasche ergebende Deficit auf dieselben Ursachen zurückführen lassen würde, welche für das künstliche Salz massgebend waren. Die hierauf bezüglichen directen Versuche haben diese Vermuthung in vollem Umfange bestätigt. Wenn man die Glycerin- oder Glüh-Asche der Knochen, gleichgültig welcher Provenienz, zunächst durch Erhitzen zur Weissgluth von Kohlensäure und Krystallwasser befreit und hierauf mit wasserfreier Kieselsäure glüht, so erleidet sie einen Gewichtsverlust[1]); derselbe reicht hin, um das bei der betreffenden Asche beobachtete Deficit zu decken, ist dem Ueberschuss der Basis sehr annähernd äquivalent und muss demnach auf das der Basicität der Knochenasche entsprechende Constitutionswasser bezogen werden. Wenn wir die für Letzteres gefundenen Werthe den früher gegebenen analytischen Daten hinzufügen, und dadurch die Analysen zu vollständigen machen, so gewinnen

---

[1]) Das Fluor, welches bei dieser Behandlungsweise ebenfalls als Fluorsilicium entweicht, kann seiner geringen Menge wegen die Höhe des Gewichtsverlustes nur ganz unwesentlich beeinflussen.

wir über die Zusammensetzung der Glycerinaschen folgende Uebersicht:

Procente.	Rinderzähne A.	Rinderzähne B. Zahnschmelz.	Rinderzähne B. Zahnbein.	Menschenknochen.	Rinderknochen.	Gänseknochen.
CaO	50,70	51,98	50,36	51,31	51,28	51,01
MgO	1,52	0,53	1,83	0,77	1,05	1,27
K_2O	0,20	0,20	0,14	0,32	0,18	0,19
Na_2O	1,16	1,10	0,80	1,04	1,09	1,11
Krystallwasser . . .	2,21	1,80	2,90	2,46	2,33	3,05
P_2O_5	38,88	39,70	38,60	36,65	37,46	38,19
CO_2	4,09	3,23	3,97	5,86	5,06	4,11
Cl	0,05	0,21	0,03	0,01	0,04	0,06
Constitutionswasser .	1,27	1,17	1,25	1,32	1,37	1,07
Summe	100,14	99,92	99,88	99,74	99,86	100,06
Aequivalente.						
P_2O_5	1,6428	1,6775	1,6308	1,5485	1,5828	1,6136
CO_2	0,1859	0,1468	0,1805	0,2664	0,2300	0,1868
Cl	0,0015	0,0059	0,0009	0,0009	0,0011	0,0017
Constitutionswasser .	0,1411	0,1300	0,1388	0,1466	0,1522	0,1188
Summe der sauren Aequivalente . . .	1,9713	1,9602	1,9510	1,9618	1,9661	1,9209
Aequivalente.						
CaO	1,8128	1,8564	1,7986	1,8328	1,8314	1,8218
MgO	0,0760	0,0265	0,0915	0,0385	0,0525	0,0635
K_2O	0,0045	0,0043	0.0030	0,0068	0,0038	0,0040
Na_2O	0,0374	0,0355	0,0258	0,0335	0,0352	0,0358
Summe der basischen Aequivalente . . .	1,9307	1,9227	1,9189	1,9116	1,9229	1,9251

Zunächst bemerken wir, dass sich die gefundenen Procentzahlen sehr annähernd zu Hundert ergänzen. Daraus können wir die Gewissheit schöpfen, dass neben den angeführten Stoffen kein andrer in nennenswerther Menge in den Knochen vorkommt. Ferner können wir constatiren, dass der durch Kieselsäure abspaltbare Körper, wenn man ihn den Säuren zugesellt, den Unterschied der sauren und basischen Aequi-

valente so genau ausgleicht, als es die unvermeidlichen Analysenfehler irgend zulassen. Wir haben es also mit Säurewasser zu thun, dessen Auffindung unsere früher entwickelten Anschauungen über die Basicität des Knochenphosphats keineswegs alterirt, sondern nur ein andrer Ausdruck für dieselben ist.

Die für das Calciumphosphat gegebene Formel lässt sich auch auf die Mineralstoffe der Knochen übertragen; nur haben wir uns zu vergegenwärtigen, dass in Letzteren 2—3 % Kalk durch äquivalente Mengen von Magnesia, Kali und Natron, und 3—4 % Phosphorsäure durch Kohlensäure, Chlor und Fluor vertreten sind. Ausserdem ist die Menge des Krystallwassers auf 1 Molekül zu reduciren[1]). Der individuelle Charakter einer Knochenasche wird dadurch bestimmt, dass der substituirte Antheil bald etwas grösser, bald etwas geringer ist, jedoch so, dass sich die Schwankungen stets innerhalb sehr enger Grenzen bewegen.

In der Formel ($Ca_3(PO_4)_2 + Ca_5HP_3O_{13}$ + aqua) kommen auf 15 Aequivalente Phosphorsäure 16 Aequivalente Kalk. Auf Grund unserer Berechnungen hatten wir das Verhältniss von Säuren zu Basen in den Knochen wie 18 : 19 angenommen, eine Abweichung, welche sicherlich innerhalb der zulässigen Fehlergrenzen liegt. — In vorstehender Formel finden ferner das Verhalten der Knochenasche gegen eine neutrale Lösung von Ammoniumcitrat, sowie der Grad der Löslichkeit in diesem Reagens ihren natürlichen Ausdruck (s. S. 289).

Die Anschauungen, welche wir uns über die Constitution der in den Knochen enthaltenen Mineralstoffe gebildet haben, weichen in vielen Punkten von den bisher geltenden Ansichten erheblich ab; dagegen zeigen sie eine gewisse Annäherung an die von C. Aeby (23) vertretene Auffassung über die Zusammensetzung der Knochenasche. Es liegt jedoch hier der eigenthümliche Fall vor, dass die Uebereinstimmung der beiderseitigen Resultate nicht eine Bestätigung im gewöhnlichen Sinne involvirt. Die experimentelle Grundlage von Aeby's

---

[1]) Durch vorliegende Versuche betrachte ich nur das Vorhandensein, nicht aber die Menge des Krystallwassers als exact bewiesen (s. S. 283).

Resultaten gibt zu den gewichtigsten Bedenken Anlass, welchen besonders F. Wibel (25) beredten und energischen Ausdruck verliehen hat. Wenn Aeby (24) den Einwendungen Wibel's gegenüber hervorhebt, dass seine Anschauungen als der Ausdruck speculativer Betrachtungen über die Metamorphose der Knochen anzusehen sind, so gibt er damit selbst zu, dass er uns den exacten und zwingenden Beweis für seine Behauptungen schuldig geblieben ist. Wir können daher lediglich die Thatsache constatiren, dass Aeby auf dem Wege der Speculation der Wahrheit in manchen Punkten ziemlich nahe gekommen ist.

Anhangsweise möchte ich noch auf eine interessante Erscheinung aufmerksam machen, welche ich bei sämmtlichen Analysen beobachtet habe, ohne dass ich in der Lage bin, eine ausreichende Erklärung dafür geben zu können. — Wenn man nämlich Knochenasche einige Zeit (15 Min.) zur Weissgluth erhitzt, so erscheint sie nach dem Erkalten nicht, wie man nach ihrer Zusammensetzung erwarten sollte, rein weiss, sondern röthlich. Die Farbe ist meist licht rosa, zuweilen auch lachsfarben oder mehr amethystartig und erinnert an die Nüancen der Kobaltsalze. Sie zeigt sich nur an der Oberfläche der Substanz und da, wo Letztere dem Boden des Tigels anhaftet, also der grössten Hitze ausgesetzt ist. Einen ganz auffälligen Grad von Intensität erreicht die Rothfärbung beim Zahnschmelz. Höchst merkwürdig ist es, dass sich von der gleichmässig blass rosa gefärbten Oberfläche häufig tief dunkelrothe Punkte abheben, welche den Eindruck erwecken, als ob die die Färbung bedingende Substanz in scharfer localer Begrenzung vorhanden sei. Der aus der Lösung der Knochenasche mit Ammoniumoxalat gefällte Kalk ist rein weiss, verwandelt man ihn aber in Calciumphosphat, so nimmt derselbe beim Glühen wieder Rothfärbung an.

Von allen bekannten Salzen und Metalloxyden sind es die seltenen Erden, auf welche die beobachteten Färbungen am besten passen. A. Cossa (29) hat sich durch mineralchemische Untersuchungen überzeugt, dass die Metalle der

Cer-Gruppe in Spuren sehr verbreitet sind; er hat ihre Anwesenheit im Apatit, im carrarischen Marmor, in verschiedenen Pflanzenaschen constatiren können und hat sie auch in der Knochenasche, nicht nur spectralanalytisch, sondern durch Abscheidung in Form ihrer Oxalate nachgewiesen. Ein Kilo Knochenasche lieferte 0,03 gr. Oxalate.

Ich habe mich vergeblich bemüht, aus den von mir untersuchten Aschen seltene Erden zu isoliren. Macht man die Lösungen stark salzsauer, so bleiben sie nach Zusatz von Oxalsäure absolut klar; säuert man nur schwach an, so fällt viel Calciumoxalat, ohne dass eine Anreicherung an seltenen Erden wahrnehmbar wäre. Trotzdem will ich nicht in Abrede stellen, dass die von Cossa angegebenen höchst geringfügigen Mengen von Cer, Lanthan, Didym auch in meinen Analysenobjecten vorhanden waren; nur erscheint es mir mehr als fraglich, ob solch minimale Quantitäten so lebhafte Färbungen hervorbringen können. Es ist mir nicht gelungen, durch Beimischung eines Minimums von Cermetallen zu reinem Calciumphosphat die beobachteten Färbungen künstlich zu erzeugen; ebensowenig lieferte eine Zugabe von Mangansalzen, an welche man ebenfalls denken könnte, ein positives Resultat. Ich behalte mir vor, über die Ursache der beim Glühen der Knochen auftretenden Rothfärbung specielle Versuche anzustellen. Voraussichtlich dürfte der Spectralapparat dabei gute Dienste leisten.

Die hauptsächlichsten Ergebnisse vorliegender Untersuchungen lassen sich folgendermassen formuliren:

1. Die Mineralstoffe der Knochen und Zähne enthalten als wesentliche Bestandtheile: Kalk, Magnesia, Kali, Natron, Wasser, Phosphorsäure, Kohlensäure, Chlor, Fluor; ausserdem eine Substanz, welche beim anhaltenden Glühen der Knochenasche deren Rothfärbung bedingt.

2. Die Quantitäten der beiden Hauptbestandtheile, Kalk und Phosphorsäure, sind nur unerheblichen Schwankungen unterworfen, welche denen der Magnesia und Kohlensäure

umgekehrt proportional sind, so dass sich sowohl die beiden Basen, wie die beiden Säuren zu einer constanten Grösse ergänzen.

3. Im Gegensatz zu den übrigen Geweben des Thierkörpers enthalten die Knochen und Zähne weit mehr Natron als Kali.

4. Die Menge des Chlors beträgt nur wenige hundertstel Procente; der Zahnschmelz nimmt jedoch eine Ausnahmsstellung ein und ist durch relativ hohen Chlorgehalt (0,21 %) ausgezeichnet.

5. Das Fluor muss ebenfalls als Minimalbestandtheil der Knochen und Zähne bezeichnet werden; seine Menge geht in der Regel nicht über 0,05 % der Asche hinaus und erreicht nur in Ausnahmsfällen 0,1 %. Die Zähne sind nicht fluorreicher als die Knochen; ebensowenig enthält der Zahnschmelz mehr Fluor als das Zahnbein.

6. Das Wasser ist in den Mineralstoffen der Knochen und Zähne in zweierlei Form vorhanden: der eine Theil entweicht bei Temperaturen von 300—350° C. und besitzt die Funktionen des Krystallwassers; der andre kann durch Hitze allein überhaupt nicht ausgetrieben werden, wohl aber durch Glühen mit Kieselsäure. Dieser letztere Antheil ist ein Ausdruck für die Basicität des Knochenphosphats und muss im Gegensatz zum Krystallwasser als Constitutions- oder Säure-Wasser betrachtet werden.

7. Das Knochenphosphat besitzt basischen Charakter; es enthält auf 15 Aequivalente Säure 16 Aequivalente Basis und stellt wahrscheinlich eine lockere Verbindung eines neutralen mit einem basischen Phosphat dar.

8. Zusammensetzung und Eigenschaften der Knochen- und Zahn-Asche finden ihren einfachsten Ausdruck in der Formel ($Ca_3(PO_4)_2 + Ca_5HP_3O_{13}$ + aq.), in welcher 2—3 % Kalk durch Magnesia, Kali, Natron und 4—6 % Phosphorsäure durch Kohlensäure, Chlor, Fluor vertreten sind.

9. Der individuelle Charakter einer Knochen- und Zahn-Asche wird dadurch bestimmt, dass der substituirte Antheil

des Kalks und der Phosphorsäure bald etwas grösser, bald etwas geringer ausfällt, jedoch derart, dass die hierdurch bedingten Schwankungen sich stets innerhalb sehr enger Grenzen bewegen.

10. Die Unterschiede, welche zwischen Knochen- und Zahnasche obwalten, sind nicht grösser, als diejenigen, welche zwischen Knochenaschen verschiedener Provenienz beobachtet werden.

11. Die Mineralstoffe des Schmelzes sowohl, wie die des Zahnbeins besitzen den allgemeinen Charakter der Knochenasche; sie unterscheiden sich dadurch von einander, dass im Schmelz eine auffällig geringe, im Zahnbein eine auffällig grosse Menge von Kalk durch Magnesia ersetzt ist. Ausserdem enthält der Schmelz relativ viel Chlor.

Litteratur.

1. Morichini. Mem. di mathem. e di fisica della science, Bd. 10.
2. John. Bulletin de la Soc. imp. des Naturalistes de Moscou 1893.
3. Klaproth. Gehlen's Journal, Bd. 3.
4. Morichini u. Gay-Lussac. Ann. de Chimie et de Phys., Bd. 55.
5. Fourcroy u. Vauquelin. Ann. de Chimie et de Phys., Bd. 57.
6. Wollaston u. Brande. Journal of natural Philosophy, Chemistry and the Arts, Bd. 13.
7. Berzelius. Ann. de Chimie et de Phys., Bd. 61.
8. Berzelius. Gilbert's Ann., Bd. 53.
9. Rees. Philosophical Magazine, Bd. 15.
10. Girardin u. Preisser. Comptes Rend. etc., Bd. 15.
11. Erdmann. Journ. f. prakt. Chemie, Bd. 19.
12. Marchand. Journ. f. prakt. Chemie, Bd. 27.
13. Middleton. Philos. Magazine, Bd. 25.
14. Daubeny. Philos. Magazine, Bd. 25.
15. v. Bibra. Chem. Unters. über die Knochen etc. Schweinfurth 1844.
16. Wilson. Transactions of the Royal Soc. of Ed., Bd. 6.
17. Heintz, Poggend. Ann. d. Phys. u. Chemie, Bd. 77.
18. Hoppe-Seyler. Archiv f. path. Anatomie u. Physiologie, Bd, 24.
19. v. Kobell. Journal f. prakt. Chemie, Bd. 92.
20. Zalesky. Med.-chem. Untersuchungen v. Hoppe-Seyler, Bd. 1.
21. Fresenius. Zeitschr. f. anal. Chemie, Bd. 5.

22. Wildt. Ueber die chem. Zus. der Knochen etc. Diss. Leipzig 1872.
23. Aeby. Kolbe's Journ. f. prakt. Chemie, Bd. 5, 6 u. 7.
24. Aeby. Kolbe's Journ. f. prakt. Chemie, Bd. 9.
25. Wibel. Kolbe's Journ. f. prakt. Chemie, Bd. 9.
26. Fresenius. Quant. Analyle 1875, S. 435.
27. Schrodt. Landw. Versuchsst., Bd. 19.
28. Hiller. Landw. Versuchsst., Bd. 31.
29. Cossa. Atti d. Reale Acc. dei Lincei, Ser. 3, Bd. 3.
30. Weiske. Landw. Versuchsst., Bd. 36.
31. Carnot. Comptes Rend., Bd. 114, S. 750.
32. Carnot. Comptes Rend., Bd. 114, S. 1189.
33. Brandl u. Tappeiner. Zeitschr. f. Biologie, N. F., Bd. 10.
34. Deltour. Bull. Ass. Belge Chimique, Bd. 6.
35. Rammelsberg. Pogg. Ann. d. Phys. u. Chemie, Bd. 64.
36. Boussingault. Ann. de Chimie et de Phys., Bd. 16.
37. Kühne. Physiol. Chemie, 1868, S. 397.
38. v. Recklinghausen. Archiv f. path. Anatomie, Bd. 14.

Beiträge zur Kenntniss der Alkaptonurie.

II. Mittheilung.

Von

Heinrich Embden.

(Aus dem ehem. Laboratorium der med. Fakultät zu Freiburg i. B., Prof. E. Baumann.)

(Der Redaction zugegangen am 18. Juli 1893.)

Dem von Baumann[1][2], Kraske[1] und Wolkow[2] untersuchten Falle von Alkaptonurie, an welchem es den genannten Autoren zum ersten Mal gelang, Constitution und Herkunft einer Alkaptonsubstanz mit Sicherheit festzustellen, habe ich[3] in meiner ersten Mittheilung einen zweiten ganz analogen Fall angereiht, indem ich nachwies, dass die Schwester des oben erwähnten Patienten ebenfalls einen homogentisinsäurehaltigen Harn entleert. Ferner wurde gezeigt, dass die augenfälligen Symptome der Alkaptonurie bei beiden Geschwistern seit der Säuglingszeit ununterbrochen bestehen, und schliesslich der Nachweis geführt, dass die beiden Alkaptonpatienten mit ihrer Stoffwechselanomalie in ihrer Familie und Umgebung vollständig isolirt dastehen.

Zur Zeit meiner ersten Publikation war mir leider ein von Garnier und Voirin[4] mitgetheilter Fall von Alkaptonurie entgangen, welchen diese Autoren nach den von Wolkow und Baumann angegebenen Methoden untersucht haben. Es handelte sich um einen Patienten, der, wie Garnier und Voirin ausdrücklich hervorheben, in zwei französischen

---

[1]) Baumann und Kraske, Münch. med. Wochenschr. 1891, No. 1.

[2]) Wolkow und Baumann, Zeitschrift für physiolog. Chemie, Bd. XV, S. 228.

[3]) Zeitschrift für physiolog. Chemie, Bd. XV, S. 182.

[4]) Garnier et Voirin, Archives de Physiologie. Cinquième Série Tome IV No. 2, April 1892, S. 225.

Universitätsstädten auf Grund der reducirenden Eigenschaften seines Harns als Diabetiker angesehen worden war, bis Garnier und Voirin durch die von ihnen beobachtete optische Inactivität des fraglichen Urins auf die richtige Diagnose geleitet wurden. Da ihnen nur geringe Harnquantitäten zur Verfügung standen, mussten sie sich mit der qualitativen Untersuchung der reducirenden Substanz begnügen und darauf verzichten, die näheren Verhältnisse der Ausscheidung zu verfolgen. Sie stellten die Alkaptonsubstanz aus einem Tagesquantum des Urins auf bekannte Weise dar und fanden sie mit der von den deutschen Autoren beschriebenen Homogentisinsäure identisch. Auffallend erscheint, neben einigen unten zu erwähnenden mehr theoretischen Bemerkungen der Verfasser, die Angabe, dass der Harn, sowie die isolirte Säure alkalische Wismuthlösung reducirt habe, ein Verhalten, welches mit dem bisher beobachteten in Widerspruch steht. Der Fall ist insofern interessant, als er zeigt, dass Verwechselungen der Alkaptonurie mit Glykosurie durchaus nicht in das Gebiet der Unmöglichkeiten gehören, sodass vielleicht, bei weiterer Verbreitung der Kenntniss der Alkaptonurie dieselbe nicht mehr als eine so eminent seltene Anomalie erscheinen wird, wie es aus der spärlichen Zahl der beschriebenen Fälle den Anschein hat.

Während nun Garnier und Voirin, in Uebereinstimmung mit fast allen andern Beobachtern, neben der Alkaptonsubstanz andere reducirende Körper, insbesondere Traubenzucker, mit Sicherheit ausschliessen konnten, ist neuerdings von Geyger[1]) eine Alkaptonurie beobachtet worden, welche in dieser, wie auch in anderer Beziehung wesentlich abweichende und interessante Verhältnisse darbietet.

Es trat nämlich im Harn eines Diabetikers, welcher schon seit Wochen fortlaufend von Geyger untersucht wurde, eines Tages in beträchtlicher Menge eine Substanz auf, welche Fehling'sche Lösung reichlich reducirte, ohne mit Hefe zu

---

[1]) A. Geyger, Glykosurinsäure im Harn eines Diabetikers. Pharmaceutische Zeitung, 6. Aug. 1892, S. 488.

vergähren. Während nämlich zur Reduction von 10 cbcm. Fehling'scher Lösung 0,4 cbcm. des unverdünnten Harns genügten, woraus sich ein Zuckergehalt von 12,5 % berechnen würde, liessen sich durch Vergährung nur 1,4 % Zucker nachweisen. Schüttelte man nun den mit Schwefelsäure angesäuerten Harn mit Aether aus, so verbrauchten 10 cbcm. Fehling'scher Lösung 4 cbcm. desselben, entsprechend einem Zuckergehalt von ca. 1,25 %. Bei der Untersuchung der dem Harn durch Aether entzogenen Substanz kam Geyger auf die Vermuthung, er habe es mit Marshall's Glykosursäure zu thun; in der That gelang es ihm, aus 250 cbcm. Harn nach dem von Marshall angegebenen Verfahren eine Säure herzustellen, welche weisse Prismen bildete, bei 143° schmolz und deren Bleisalz 33,64 % Blei enthielt. Auf Grund dieser Daten, sowie des sonstigen Verhaltens der Säure kam Geyger, welchem die beiden Freiburger Fälle nicht bekannt waren, zu dem Schluss, es liege in der That Marshall's Glykosursäure vor.

Als Geyger's Mittheilung uns zu Gesicht kam, fiel uns sofort die grosse Uebereinstimmung der von ihm isolirten Substanz mit der Homogentisinsäure auf; die Identität beider Körper war um so wahrscheinlicher, als Wolkow und Baumann bereits mit grosser Wahrscheinlichkeit Marshall's Säure als Homogentisinsäure gedeutet hatten[1]). Herr Dr. Geyger hatte die Güte, meine brieflich ausgesprochene diesbezügliche

---

[1]) Diese Vermuthung konnte Herr Prof. Baumann an einer ihm von Herrn Prof. Marshall gütigst zur Verfügung gestellten Probe der «Glykosursäure» bestätigen. Herr Prof. Baumann hatte die Güte, mir seine diesbezüglichen Untersuchungen zur Veröffentlichung zur Verfügung zu stellen. Er untersuchte das Bleisalz der Marshall'schen Säure und fand bei der Schmelzpunkts- und der Krystallwasserbestimmung mit dem homogentisinsauren Blei übereinstimmende Werthe. 0,2110 gr. lufttrockenes Salz verloren bei 100° 0,019 gr. H_2O.

	Berechnet für: $C_{16}H_{14}O_8Pb. + 3H_2O$:	Gefunden:
H_2O =	9,08 %.	9,01 %.

Das Salz schmolz in Uebereinstimmung mit dem der Homogentisinsäure bei 215°.

Vermuthung dahin zu bestätigen: «er sei fest davon überzeugt, dass die Säure mit der Homogentisinsäure identisch sei». In der That stimmen beide Körper in ihrem Verhalten gegen ammoniakalische Silberlösung, alkalische Wismuthlösung, Eisenchlorid, sowie beim Erhitzen vollständig überein. Auch der Gehalt des Bleisalzes (Geyger 34,64 % Pb.) an Blei stimmt sehr gut mit dem des krystallwasserhaltigen Bleisalzes der Homogentisinsäure (34,79 % Pb.). Leider reichte Geyger's Substanz nicht für eine Elementaranalyse aus, denn, und darin unterscheidet sein Fall sich von allen bisher bekannten, die Erscheinung der Alkaptonurie dauerte nur einen Tag. Erst später, als der Zuckergehalt des Urins vollständig verschwunden war, konnte Herr Dr. Geyger, wie ich ebenfalls einer brieflichen Mittheilung entnehme, die Säure noch einmal nachweisen; sonst wurde sie während wochenlanger Untersuchung vermisst. Herr Dr. Geyger hatte die Güte hinzuzufügen, dass der Kranke während der Beobachtungsdauer mit Extr. folior. Myrtilli behandelt wurde, dass aber im Harn anderer Diabetiker, welche dasselbe Extract nahmen, die Säure nicht aufzufinden gewesen sei.

Dieser Fall Geyger's weicht also von den übrigen Fällen, in welchen Homogentisinsäure nachgewiesen wurde (Baumann und Kraske, Marshall, Garnier und Voirin, Embden), nicht nur darin ab, dass die Säure einmal neben Glykose[1]) auftrat, sondern vor allem darin, dass die Erscheinung der Alkaptonurie keine dauernde, sondern eine sporadisch auftretende gewesen ist.

Mit der Besprechung der Arbeiten von Garnier und Voirin und Geyger ist die ganze Alkaptonurie-Litteratur des letzten Jahres erledigt.

Ich lasse jetzt die Mittheilung der am Schlusse meiner ersten Publikation erwähnten Stoffwechselversuche an der

---

[1]) Auch in Boedeker's Fall wurde neben dem Alkapton einmal gährungsfähiger Zucker beobachtet. Da aber über die Natur des Boedeker'schen Alkaptons nichts bekannt ist (Boedeker gibt an, dasselbe sei N-haltig), so ziehen wir seinen Fall hier nicht zum Vergleich heran.

Alkaptonpatientin, sowie einer Reihe daran anschliessender Versuche am normalen Menschen (Verf.), sowie am Hunde folgen. Ehe ich jedoch in die Schilderung der einzelnen Experimente eingehe, erscheint es zur Vermeidung von Wiederholungen zweckmässig, einiges über die Ziele dieser Versuche, sowie über die zur Anwendung gekommenen Untersuchungsmethoden vorauszuschicken.

Plan und Methode der Versuche.

Seitdem Wolkow und Baumann bei ihrem Patienten die Bildung der Homogentisinsäure aus dem Tyrosin erwiesen und diese Umwandlung als einen den Gährungsvorgängen analogen Process gedeutet haben, ist die Frage nach dem Orte der Alkaptonbildung in den Vordergrund des Interesses getreten. Aus den in meiner ersten Mittheilung rekapitulirten Gründen haben Wolkow und Baumann die Hypothese aufgestellt, es handle sich bei der Alkaptonurie um eine abnorme, durch pflanzliche, hefeartige Mikroorganismen vermittelte, im Darmkanal sich abspielende Umwandlung des Tyrosins. Durch diese Hypothese waren dem Experimente ganz bestimmte Bahnen vorgezeichnet. Es musste geprüft werden, ob durch Maassnahmen, welche erfahrungsgemäss die Gährungs- und Fäulnissprocesse im Darmkanal herabsetzen, die Quantität der ausgeschiedenen Homogentisinsäure beeinflusst werde. Nach Erledigung der Vorfrage, ob auch bei unserer Patientin das Tyrosin als Muttersubstanz der Homogentisinsäure anzusehen sei, ob es ferner vielleicht durch andere, ähnlich constituirte aromatische Körper vertreten werden könne, haben wir uns der eben gekennzeichneten Aufgabe in mehreren Versuchsreihen zugewandt. Wir haben damit ein in derselben Richtung sich bewegendes Experiment von Wolkow und Baumann ergänzt. Weiter war es ebenfalls im Hinblick auf die oben gestellte Hauptfrage von Interesse, das Verhalten in den Darmkanal der Alkaptonpatientin eingeführter Homogentisinsäure kennen zu lernen. Die natürliche Ergänzung dieses Experiments bilden Versuche, bei welchen normalen Menschen Homogentisinsäure einverleibt wurde. Dieser Versuch gewann

erhöhte Wichtigkeit, als man bei der Alkaptonpatientin auf Anomalieen der Harnsäureausscheidung aufmerksam geworden war. Die bezüglichen, in meiner ersten Mittheilung kurz erwähnten Verhältnisse werden in einem besonderen Abschnitte abgehandelt werden. — Endlich schien es zur Ergänzung eines von Wolkow und Baumann angestellten Versuches wünschenswerth, den Urin eines Hundes bei subcutaner Einverleibung der Homogentisinsäure zu untersuchen.

Ueber die angewandten Methoden kann ich mich kurz fassen. Die quantitative Bestimmung der Homogentisinsäure im Harn geschah nach der von Wolkow und Baumann ausgearbeiteten Methode, bezüglich deren Einzelheiten ich auf Baumann's Mittheilung[1]) verweise. Die Methode ist durchaus nicht, wie Garnier und Voirin meinen, als eine besonders delikate und zeitraubende anzusehen. Die Erkennung der Endreaction, Bildung von Chlorsilber, wird nach unseren Beobachtungen dadurch sehr erleichtert, dass die tiefbraune alkalische Flüssigkeit beim Zusatz von Salzsäure eine lichtrothe Farbe bekommt, sobald die Endreaction nahe, d. h. sobald keine oder wenig unoxydirte Substanz mehr darin vorhanden ist. Es wurde immer nur bis auf $^1/_4$ cbcm. der Zehntel Norm.-Silber-Lösung genau titrirt, weil für uns nur die Feststellung grösserer Schwankungen des Homogentisinsäuregehalts Interesse hatte.

Grössere Schwierigkeiten boten die Harnsäurebestimmungen. Zwar war die Wahl der passenden Methode leicht, weil bei einem Alkaptonharn alle diejenigen Methoden, bei welchen die Harnsäure als Silbersalz gefällt wird, sich von selbst verbieten. Es waren also die Verfahren nach Ludwig, Haycraft und Czapek nicht anwendbar. Das Verfahren von Arthaud und Butte bot, nach Huppert's Bemerkungen[2]), keine genügende Garantie für Genauigkeit. Die alte Methode von Heintz leidet bekanntlich ebenfalls an Ungenauigkeit und war in unserem speciellen Falle deshalb nicht

---

[1]) E. Baumann, Ueber die Bestimmung der Homogentisinsäure im Alkaptonharn. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 16, S. 268.

[2]) Anal. d. Harns, S. 551.

anzuwenden, weil im Harne der Alkaptonpatientin mit Salzsäure überhaupt keine Harnsäureabscheidung erfolgte[1]). Es blieb also nur das Verfahren von Fokker, Wägung der Harnsäure als harnsaures Ammoniak, übrig. Es wurde in der von Salkowski angegebenen Modification, genau nach dessen Vorschriften, angewandt, mit Innehaltung einiger durch die Besonderheit der Verhältnisse gebotenen Vorsichtsmassregeln. Da man nämlich den alkalisch gemachten Harn 2 × 24 Std. stehen lassen muss, so hätte die dabei in einem Becherglase unvermeidlich eintretende Oxydation des Alkaptons wegen der damit verbundenen Dunkelfärbung und der manchmal erfolgenden Abscheidung humusähnlicher Massen zu grossen Uebelständen geführt. Ferner unterliegt, wie unsere Erfahrungen gezeigt haben, der Alkaptonharn viel leichter als normaler Harn der ammoniakalischen Gährung, er ist ferner in weit höherem Grade als dieser der Bildung von Pilzrasen ausgesetzt; beides Factoren, die zu Unbequemlichkeiten (äusserst langsames Filtriren, Trübung des Filtrats durch Bacterien) und Fehlern (bei bedeutenderer Pilzentwickelung) führen. Es gelang, die gekennzeichneten Mängel auf einfache Weise zu vermeiden. Das Reactionsgemisch wurde in wohlverschlossenen Erlenmeyer'schen Kölbchen stehen gelassen, aus welchen der Niederschlag leicht aufs Filter gebracht werden kann. Es wurden Kölbchen gewählt, welche ca. 240 cbcm. fassen, so dass über der Flüssigkeit nur wenige Cubiccentimeter Luft eingeschlossen sind. Um ferner die ammoniakalische Gährung und die Pilzentwickelung hintenanzuhalten, wurde das Gemisch mit einigen Tropfen Aether durchgeschüttelt, und zwar wurde soviel Aether hinzugefügt, dass er in dünner Schicht die Flüssigkeit gegen die Luft abschloss. Damit nicht etwa der Aether die vollständige Fällung der Harnsäure beeinträchtige, wurde derselbe erst 2—3 Stunden nach dem Salmiakzusatz hinzugefügt. Nach 2 × 24 Stunden wurde die Aetherschicht mit der Pipette abgehoben und im Uebrigen nach Salkowski verfahren. Bei Anwendung dieser Vorsichtsmassregeln zeigte der Harn im Kolben nur in seinen obersten Schichten eine

[1]) Embden, l. c., S. 190, Anm.

leichte bräunliche Verfärbung; im Uebrigen erschien er vollkommen normal und liess sich gut filtriren.

Es erübrigt der Nachweis, dass die Anwesenheit der Homogentisinsäure im Harn die Genauigkeit der Methode nicht beeinflusst. Dieser Nachweis wurde durch Parallelbestimmungen in normalem Harn geführt, so zwar, dass eine Portion (200 cbcm.) ohne Zusatz, eine gleiche Portion desselben Harns nach Zusatz von reiner Homogentisinsäure untersucht wurde. Die Menge der Homogentisinsäure wurde, dem durchschnittlichen Gehalt des Alkaptonharns entsprechend, zu 0,2—0,3 % gewählt. Es seien die Resultate zweier Parallelbestimmungen, mit der Correctur von Salkowski, angeführt:

	Harnsäure in	
	200 cbcm. unversetztem Harn.	200 cbcm. Harn mit 10 cbcm. 4,4 proc. Homogentisinsäure-Lösung.
I.	0,0655 gr.	0,0606 gr.
II.	0,0700 gr.	0,0766 gr.

Aus den angeführten Zahlen ergibt sich die Anwendbarkeit der Fokker'schen Methode für den Alkaptonharn.

Die übrigen im Laufe der jetzt mitzutheilenden Untersuchungen angewandten Methoden sind die allgemein üblichen.

Quantitative Versuche über die Alkaptonausscheidung bei gemischter Kost, bei Zufuhr von Tyrosin, Phenylessigsäure und Phenylamidoessigsäure.

I. Normale Verhältnisse.

Ueber die normalen Verhältnisse der Homogentisinsäureausscheidung gibt Tabelle I auf Seite 9 Aufschluss.

Aus derselben geht hervor, dass unsere Patientin bei gemischter Kost und einer durchschnittlichen täglichen Harnmenge von 1200 cbcm. täglich im Durchschnitt 3,2 gr. Homogentisinsäure (entsprechend 8,39 gr. Silber)[1]) ausscheidet. Bei

[1]) S. Baumann, l. c., S. 270.

Tabelle I.

Datum.	Harnmenge.	Spec. Gew.	Reduction in cbcm. $^1/_{10}$ Norm.-Ag-Lösg. und 10 cbcm. Harn.	Reduction in gr. Ag. berechnet für die Tagesmenge.	Reaction.	Bemerkungen.
7. XI.	1000	1,020	8,75	9,44	sauer	Die Kranke erhält an allen diesen Tagen gewöhnliche gemischte Kost.
9. XI.	1020	1,015	6,5	7,15	stark sauer	
10. XI.	1100	1,016	6,5	7,71	sauer	
15. XI.	2570	1,013	6,75	9,47	stark sauer	Acidität: 100 cbcm. Harn = 11,0 cbcm. $^1/_{10}$ Norm.-Kalilauge.
16. XI.				9,47	—	
18. XI.	1100	1,018	9,25	10,97	sauer	Acidität: 100 cbcm. Harn = 10 cbcm. $^1/_{10}$ Norm.-Kalilauge.
19. XI.	1200	1,014	6,25	7,78	alkalisch	Leichter Blasenkatarrh.
20. XI.	1290	1,016	6,75	9,40	alkalisch	Ebenso.
21. XI.	1400	1,015	5,0	7,55	alkalisch	Ebenso.
22. XI.	1425	1,011	4,0	6,13	alkalisch	Trübung des Urins geringer.
24. XI.	1040	1,014	7,25	8,14	stark sauer	Acidität: 100 cbcm. Harn = 17 cbcm. $^1/_{10}$ Norm.-KOH.
25. XI.	1400	1,014	7,0	10,57	stark sauer	Acidität: 100 cbcm. Harn = 16 cbcm. $^1/_{10}$ Norm.-KOH.
2. XII.	1000	1,019	8,0	8,63	sauer	
3. XII.	1500	1,015	6,75	10,83	stark sauer	
9. XII.	1400	1,017	7,25	10,95	sauer	
10. XII.	1200	1,014	5,75	6,33	stark sauer	
11. XII.	1450	1,016	7,75	12,12	sauer	
15. XII.	1100	1,015	6,5	7,72	sauer	
20. XII.	3300	1,012	4,5	7,90	sauer	
21. XII.				7,90		
11. XI.	1050	1,017	7,5	8,50	stark sauer	
Mittel aus 22 Tagen	1207	—	—	8,39	—	Entspricht einer durchschnittl. tägl. Ausscheidung von 3,20 gr. Homogentisinsäure. Durchnittlicher Gehalt des Harns 0,265 %.

dem Bruder unserer Patientin fanden Wolkow und Baumann unter den gleichen Bedingungen und bei einer durchschnittlichen Harnmenge von 2030 cbcm. eine durchschnittliche Reduction von 12,7 gr. Silber entsprechend einer Tagesausscheidung von 4,84 gr. der Säure[1]). Es könnte scheinen, dass der eben gekennzeichnete Unterschied bedingt sei durch die Schwierigkeit, bei einer Frau die Tagesmenge des Urins vollständig, ohne Verluste bei der Defäcation, zu gewinnen. Wir haben diesem Punkte besondere Aufmerksamkeit geschenkt und können das angeführte Bedenken mit folgenden Gründen entkräften: Erstens war an Tagen, an welchen, wie es bisweilen vorkam, eine Defäcation nicht stattfand, die Urinmenge nicht grösser als sonst; zweitens waren den häufig untersuchten Fäces niemals sichtbare Urinquantitäten beigemischt und niemals konnte Homogentisinsäure im Aetherextract der Fäces nachgewiesen werden. Unsere Patientin, die recht intelligent und unseren Bestrebungen gegenüber sehr entgegenkommend war, entleerte vor jeder Defäcation ihre Blase, was ihr bisweilen selbst dann gelang, wenn diarrhoischer Stuhl vorhanden war. Ging einmal bei der Defäcation Harn verloren, so wurden die Ergebnisse der Untersuchung nicht quantitativ verwerthet. Es ergeben sich daraus manche Lücken in unseren Versuchsreihen, so dass durch das weibliche Geschlecht unserer Patientin wohl Unbequemlichkeiten aber keine Fehlerquellen bedingt wurden. Wir glauben, dass die in Rede stehende Differenz in den ausgeschiedenen Alkaptonquantitäten sich leicht aus dem Umstande erklärt, dass unsere Patientin überhaupt nicht reichlich Nahrung zu sich nahm und dass sie, den Gewohnheiten der Schwarzwaldbevölkerung entsprechend, die vegetabilischen Bestandtheile ihrer Kostportionen bevorzugte. Nun haben Wolkow und Baumann zur Evidenz gezeigt, wie wesentlich die Quantität der ausgeschiedenen Homogentisinsäure durch die Art der Ernährung beeinflusst wird: gaben sie nämlich statt der gemischten Kost Fleischdiät, so stieg die Alkaptonmenge fast auf das Doppelte. Wir glauben, diese Verhältnisse, wie oben geschehen, zur Erklärung der in Rede

[1]) Wolkow und Baumann, l. c., S. 271.

stehenden Differenz heranziehen zu dürfen, zumal man, sollte jene Differenz wirklich aus Verlusten beim Sammeln des Urins resultiren, weit grössere Schwankungen in der täglich gemessenen Menge erwarten müsste, als sie in Tabelle I verzeichnet stehen. Auch entsprach dem reichlicheren Urin des Bruders durchweg ein um ca. 0,005 niedrigeres spec. Gew., als es dem Urin der Schwester zukam, der gewöhnlich über 1,015 zeigte.

Wir dürfen also als sichergestellt ansehen, dass in dem Urin unserer Patientin täglich durchschnittlich 1,64 gr. Homogentisinsäure weniger enthalten sind, als in dem von Wolkow und Baumann untersuchten Harn. Dieser Umstand fällt bei der Beurtheilung des im nächsten Abschnitte mitzutheilenden Versuches ins Gewicht.

II. Alkaptonausscheidung bei Zufuhr von Tyrosin.

Tabelle II.

Datum.	Harnmenge.	Spec. Gew.	Reaction.	Reduction in cbcm. $^1/_{10}$ Norm.-Ag-Lösg. für 10 cbcm. Harn.	Reduction in gr. Ag berechnet für die Tagesmenge.	Bemerkungen.
9. XI. 91.	1020	1,020	stark sauer	6,50	7,15	
10. XI. 91.	1100	1,016	sauer	6,50	7,71	
11. 91. 91.	1050	1,017	stark sauer	7,50	8,50	Im Laufe des Vormittags 15 gr. Tyrosin.
12. XI. 91.	1630	1,015	stark sauer	12,25	21,54	Acidität: 100 cbcm. Harn =23,5 cbcm. $^1/_{10}$ Norm.-KOH.
13. XI. 91.	1010	1,020	stark sauer	8,5	9,25	Viel Phenol.
14. XI. 91.	1200	1,015	stark sauer	7,5	9,71	Acidität: 100 cbcm. Harn = 19 cbcm. $^1/_{10}$ Norm.-KOH.
15. XI. 91.	} 2570	} 1,013	} stark sauer	6,75	9,47	Acidität: 100 cbcm. Harn = 11 cbcm. $^1/_{10}$ Norm.-KOH.
16. XI. 91.				6,75	9,47	NB. Der Harn hatte z. Theil 24 Stunden gestanden.

Tabelle III.

	Reduction der Tagesmenge Harn		Zunahme der Homogentisinsäure in gr.
	in gr. Ag.	auf Homogentisinsäure berechnet.	
Mittel aus 22 Tagen bei gemischter Kost	8,39	3,20	—
Nach 15 gr. Tyrosin . . .	21,54	8,21	5,01

Das Ergebniss des Tyrosinversuchs ist in den Tabellen II und III niedergelegt. Es erhellt eine beträchtliche, über 100 % betragende Vermehrung der Homogentisinsäureausscheidung am ersten Tage nach der Zufuhr von 15 gr. Tyrosin. An den folgenden Tagen ist die Alkaptonmenge noch etwas über die Norm erhöht, wie dies auch von Wolkow und Baumann beobachtet wurde. Die sich am ersten Tage geltend machende Aciditätserhöhung klingt ebenfalls allmälig ab. — Durch den hier beschriebenen Versuch ist die principielle Uebereinstimmung des von uns untersuchten Falles von Alkaptonurie mit dem von Wolkow und Baumann in allen Punkten erwiesen. Die von jenen Autoren dort angestellten, weiter oben kurz berührten theoretischen Ueberlegungen gelten auch hier.

Die quantitativen Verhältnisse freilich gestalten sich in beiden Fällen recht verschieden. Während nämlich Wolkow und Baumann[1]) einer Zufuhr von 10 gr. Tyrosin eine Zunahme der Säure um 6,9 gr., ein anderes Mal einer Tyrosinzufuhr von 11,5 gr. sogar eine Vermehrung des Alkaptons um 9,4 gr. folgen sahen, stieg in unserm Fall nach Einführung von 15 gr. der Muttersubstanz die Homogentisinsäureausscheidung nur um 5,01 gr. Während also dort eine nahezu quantitative Umwandlung des Tyrosins stattfand, haben wir nur einen kleinen Theil der eingeführten Substanz in Homogentisinsäure übergehen sehen.

Die weitere Untersuchung des Urins und der Fäces gab uns Aufklärung über dies Verhalten. Am zweiten Tage nach

[1]) L. c., S. 269.

der Tyrosineingabe zeigten sich nämlich im Destillat des Harns bei der Prüfung mit Bromwasser sehr reichliche Phenolmengen. Diese Beobachtung veranlasste eine Bestimmung der Aetherschwefelsäuren des Harns. Wie weiter unten mit Zahlen belegt werden wird, zeigte die Aetherschwefelsäureausscheidung unserer Patientin, in Uebereinstimmung mit dem von Wolkow und Baumann beobachteten, für gewöhnlich nichts abnormes. An dem genannten Tage aber stieg die Menge der gepaarten Schwefelsäure auf das Doppelte des normalen; das Verhältniss A:B wurde 4,5.

Schwefelsäure in 50 cbcm. Harn[1]) als $BaSO_4$		Schwefelsäure in der Tagesmenge als H_2SO_4.		$\frac{A}{B}$
A.	B.	A.	B.	
0,2097	0,0461	1,7800	0,3913	4,5

Leider wurde an den folgenden Tagen die Schwefelsäurebestimmung nicht wiederholt, dagegen schon 2 Tage später (15. XI. 91) constatirt, dass im Destillat des Harns mit Bromwasser kein Niederschlag mehr entstand. Wir dürfen daher wohl annehmen, dass die Ausscheidung der Phenole etwa in derselben Curve abgefallen ist, wie die der Homogentisinsäure.

Es unterlag keinem Zweifel, dass die Vermehrung der Harnphenole auf die Zufuhr des Tyrosins und dessen Spaltung durch die Darmfäulniss zurückzuführen sei. Die Untersuchung der ersten nach der Tyrosinzufuhr entleerten Fäces lieferte die Bestätigung; es gelang, in denselben eine kleine Menge Tyrosin nachzuweisen, woraus mit Sicherheit folgte, dass grössere Mengen des Körpers in das Bereich der Fäulnisserreger gekommen waren.

Die Fäces wurden nach Ansäuerung mit verdünnter Schwefelsäure mit Aether extrahirt, das Extract mit negativem Ergebniss auf Homogentisinsäure untersucht. Von den extrahirten Fäces wurde der Aether abdestillirt, der Rückstand mit neutralem Bleiacetat gefällt, filtrirt, das Filtrat entbleit, zum dünnen Syrup eingedampft und in einer Krystallisirschale

[1]) Vom 13. XI. 91.

stehen gelassen. Es schied sich eine schmierige Masse ohne Spuren von Krystallisation ab. Nunmehr wurde in verdünntem Ammoniak gelöst, abfiltrirt, das Filtrat verdunstet. Es blieb jetzt eine sehr geringe Menge einer undeutlich krystallinischen bräunlich-gelben Substanz zurück, welche deutlich die Millon'sche Reaction gab, also als Tyrosin anzusehen ist.

Wir sehen jetzt einen Grund der mangelhaften Alkaptonisirung des Tyrosins darin, dass es in grösserer Quantität Fäulnissprocessen anheimgefallen ist. Weiterhin wird das Verständniss unseres Versuchsergebnisses durch eine von Wolkow und Baumann[1]) gelegentlich eines noch zu erwähnenden Thierversuches aufgestellte Hypothese gefördert. Wir meinen die Ansicht, dass die Alkaptonbildung nur in den obersten fäulnissfreien Theilen des Darmkanals erfolge, dass das Tyrosin also, sobald es in die Region der Fäulnissprocesse gelangt ist, der Alkaptonbildung entzogen wird. Man kann in den eben mitgetheilten Versuchsergebnissen eine Stütze der eben skizzirten Hypothese sehen.

Den verschiedenen Ausfall des Tyrosinversuchs bei den Geschwistern kann man sich dann durch die Annahme einer gewissen Insufficienz der alkaptonbildenden Kräfte innerhalb der Strecke ihrer Wirksamkeit bei der Frau erklären. Diese Annahme ist im Einklang mit der oben nachgewiesenen dauernd geringeren Alkaptonproduction der Schwester.

III. Alkaptonausscheidung bei Zufuhr von Phenylessigsäure und Phenylamidoessigsäure.

(Siehe Tabelle IV auf Seite 318.)

Wolkow und Baumann[2]) haben darauf hingewiesen, dass im Organismus der Alkaptonpatienten als Muttersubstanz der Homogentisinsäure neben dem Tyrosin noch die Phenylamidopropionsäure in Betracht komme. Von diesem Körper standen uns zu einem Versuche ausreichende Mengen nicht zur Verfügung. Dagegen haben wir die Alkaptonausscheidung nach Zufuhr von Phenylessigsäure und von Phenylamidoessig-

---

[1]) L. c., S. 285.
[2]) L. c., S. 266.

säure untersucht. Zwar ist nur für die Phenylessigsäure die Entstehung bei der Eiweissfäulniss durch Salkowski nachgewiesen worden; nur sie konnte mithin möglicherweise neben dem Tyrosin als Muttersubstanz der von den Alkaptonpatienten ausgeschiedenen Homogentisinsäure eine Rolle spielen. Indessen enthält auch die Phenylamidoessigsäure den ganzen Rest, welcher in die Homogentisinsäure aus dem Tyrosin übergeht; sie steht letzterem vermöge ihrer Amidogruppe noch näher als die Phenylessigsäure. Es war also theoretisch wohl denkbar, dass die untersuchte Substanz, in den Organismus der Alkaptonpatientin eingeführt, ebenso wie die letztgenannte Säure als Alkaptonbildner fungiren könnte. Wie ein Blick auf die

Tabelle IV.

Datum.	Harnmenge.	Spec. Gew.	Reaction.	Reduction. in cbcm. 1/10 Norm.-Ag-Lösg. für 10 cbcm. Harn.	Reduction. berechnet für gr. Ag pro die.	Bemerkungen.
24. XI. 91	1040	1,014	stark sauer	7,25	8,14	
25. XI. »	1400	1,014	stark sauer	7,0	10,57	8 gr. Phenylessigsäure mit 4 gr. Natr.-bicarb. und 20 gr. Zucker im Laufe des Vorm.
26. XI. »	1700	1,015	sauer	5,25	9,63	Sulfate : $\frac{A}{B}$ = 13,4.
27. XI. »	1000	1,019	stark sauer	8,5	9,17	
28. XI. »	1500	1,014	sauer	5,0	8,09	8 gr. Phenylessigsäure wie oben.
29. XI. »	2800	1,015	stark sauer	6,5	9.81	
30. XI. »					9,81	
10. XII. »	1200	1,014	stark sauer	5,75	6,33	
11. XII. »	1450	1,016	sauer	7,75	12,12	10 gr. Phenylamidoessigsäure.
12. XII. »	1600	1,012	sauer	5,5	9,5	
13. XII. »	2100	1,017	sauer	7,75	8,78	
14. XII. »					8,78	

Tabelle IV zeigt, vermochten wir dies für keine der beiden Substanzen nachzuweisen. Die Alkaptonausscheidung wurde

durch die Zufuhr von Phenylessigsäure und Phenylamidoessigsäure in keiner Weise beeinflusst[1]).

Es scheint aus dem Versuche hervorzugehen, dass die Reduction der Para-Hydroxylgruppe ein integrirendes Moment des zur Homogentisinsäurebildung führenden Processes darstellt. Deshalb liegt die Vermuthung nahe, dass Versuche mit der α-Amidophenylpropionsäure ebenfalls ein negatives Ergebniss haben werden. Zur Aufklärung der in Rede stehenden Processe wären solche Versuche sehr wünschenswerth.

Versuche über die Alkaptonausscheidung bei Anwendung von Mitteln, welche die Fäulniss- und Gährungsprocesse im Darmkanal beschränken.

I. Ueber die Alkaptonausscheidung bei Darreichung von Terpentinöl.

Tabelle V.

Datum.	Harnmenge.	Spec. Gew.	Reaction.	Reduction. in cbcm. 1/10 Norm.-Ag-Lösg. für 10 cbcm. Harn.	Reduction. in gr. Ag berechnet für die Tagesmenge.	Bemerkungen.
11. X. 91.	1100	1,020	stark sauer	6,5	7,71	
12. X. »	ca. 1000	1,014	sauer	5,5	5,93	Im Laufe des Tages 8 gr. Terpentinöl.
13. X. »	1120	1,014	stark sauer	4,75	5,74	5 gr. Terpentinöl w. o.
14. X. »	1000?	1,024	schw. sauer	6,5	7,09	6 gr. Terpentinöl.
15. X. »	1415	1,014	stark sauer	4,0	6,10	4 gr. Terpentinöl.
16. X. »	1270	1,014	schw. sauer	4,0	5,48	5 gr. Terpentinöl.
17. X. »	1480	1,017	sauer	5,25	8,49	5 gr. Terpentinöl.
18. X. »	950?	1,017	stark sauer	5,0	5,24	Versuch unterbrochen.

[1]) Die Art der Ausscheidung der Phenylessigsäure wurde nicht weiter verfolgt. Vgl. Salkowski, E. u. H. Ber. 12, S. 653; D. Zeitschr., Bd. 7, S. 162; Bd 9, S. 229. Hotter (cit. nach Huppert, Anal. S. 139) Journal für prakt. Chem., [2], Bd. 38, S. 117.

Tabelle VI.

	Reduction	
	der Tagesmenge Harn in gr. Ag.	der Tagesmenge Harn berechnet in gr. Homogentisinsäure.
Mittel aus 6 Tagen mit Terpentinöl .	6,36	2,44
Mittel aus 2 Tagen ohne Terpentinöl im Hause der Pat.	6,82	2,60
Mittel aus 22 Tagen bei gem. Kost im Hospital	8,39	3,20

Wir wenden uns nunmehr den Versuchen zu, die Homogentisinsäureausscheidung durch die Anwendung von Mitteln zu beschränken, welche die Fäulniss- und Gährungsprocesse des Darmes herabsetzen. Bei der Wahl dieser Mittel leiteten uns vor allem die Erfahrungen, welche Rovighi[1]) bei seinen Untersuchungen über die Aetherschwefelsäureausscheidung beim Menschen gewonnen hatte. Das erste Mittel, welches versucht wurde, war das Terpentinöl, das nach Rovighi in Gaben von mehreren Gramm täglich die Aetherschwefelsäureausscheidung auf $^1/_4$ der Norm herabsetzt. Zu einem Versuche an der Alkaptonpatientin bewog uns vor allen Dingen die hemmende Wirkung, welche das Terpentinöl auf die weingeistige Gährung ausübt. Wir konnten diese Wirkung schon constatiren, wenn mit der über Quecksilber befindlichen, mit Hefe versetzten Zuckerlösung nur wenige Tropfen Terpentinöl durchgeschüttelt waren. Während die Controlröhre binnen Kurzem ganz mit Kohlensäure erfüllt war, trat in der terpentinhaltigen Flüssigkeit nur zuerst eine schwache CO_2-Entwickelung auf, die immer spärlicher werdend nach 24 Std. fast gänzlich sistirte. Da wir ja von der Hypothese von Wolkow und Baumann ausgingen, es handle sich bei der Alkaptonurie um abnorme Gährungsvorgänge im Darmkanal, so musste das Terpentinöl als besonders geeignet erscheinen, die Alkaptonbildung zu beschränken. Leider geben die Ver-

[1]) Zeitschrift f. physiol Chemie, Bd. 16, S. 20ff.

suche, deren zahlenmässiges Ergebniss aus Tabelle 5 und 6 zu ersehen ist, kein ganz unzweideutiges Resultat. Der Terpentinversuch musste nämlich aus äusseren Gründen in der Wohnung der Patientin, die in einem kleinen Hochthal des Schwarzwaldes gelegen ist, durchgeführt werden. Dabei waren Verluste an Urin kaum zu vermeiden. Es war ferner unmöglich, die von Rovighi constatirte Beeinflussung der Fäulnissprocesse an unserm Fall zu verfolgen, da mir ein Laboratorium nicht zur Verfügung stand. Die Homogentisinsäurebestimmung führte ich in der Apotheke des Herrn Apotheker Himmelseher in Neustadt[1]) aus, nachdem ich in der von dort 2 Stunden entfernten Wohnung der Patientin die von dieser gesammelte Tagesmenge des Harns gemessen hatte.

Die erhaltenen, in Tabelle 5 und 6 angeführten Reductionswerthe sind erheblich niedriger, als die später bei dem Aufenthalt in der Freiburger Klinik gefundenen. Indessen haben sich schon vor der Terpentingabe sehr niedrige Zahlen ergeben; man dürfte daher mit der Annahme nicht fehlgehen, der geringe Alkaptongehalt des Harns sei zum grössten Theil auf die, wie ich mich überzeugte, ausserordentlich eiweissarme häusliche Kost der Patientin, in welcher insbesondere Fleisch nur an Sonntagen figurirte, zurückzuführen. Ob ausserdem das Terpentinöl eine Wirkung in der in Frage stehenden Richtung geübt hat, wage ich nicht zu entscheiden. Jedenfalls liegt in den mitgetheilten Zahlen eine Aufforderung, den Versuch zu wiederholen.

Es sei noch erwähnt, dass die angewandten Terpentinölgaben ohne jede Beschwerde vertragen wurden. Die natürlich mit grösster Sorgfalt täglich ausgeführte Untersuchung des Harns auf Eiweiss hatte stets ein negatives Ergebniss.

---

[1]) Ich spreche Herrn Apotheker Himmelseher auch an dieser Stelle meinen Dank für sein freundliches Entgegenkommen aus. Ebenso benutze ich die Gelegenheit, dem Hausarzte der Alkaptonpatientin, Herrn Medizinalrath A. Bürkle, Grossherzogl. Bezirksarzt in Neustadt, für die liebenswürdige und erfolgreiche Unterstützung, die wir ihm verdanken, meinen besten Dank auszudrücken.

Tabelle VII.

Datum.	Harn-menge.	Spec. Gew.	Reaction.	Reduction. in cbcm. 1/10 Norm.-Ag-Lösg. für 10 cbcm. Harn.	Reduction. in gr. Ag berechnet für die Tages-menge.	Schwefelsäure in 50 cbcm Harn als $BaSO_4$. A.	Schwefelsäure in 50 cbcm Harn als $BaSO_4$. B.	Schwefelsäure in der Tagesmenge als H_2SO_4. A.	Schwefelsäure in der Tagesmenge als H_2SO_4. B.	$\frac{A}{B}$	Bemerkungen.
20. XII. 91.	3300	1,012	sauer	4,5	8,01	—	—	—	—	—	Seit dem 19. XII. tägl. Kefyr ca. 1 Liter.
21. XII. »					8,01	—	—	—	—	—	
8. I. 92.	1250	1,012	stark sauer	5,5	7,42	0,1316	0,0094	1,3818	0,0987	14	
9. I. »	1370	1,013	sauer	6,25	9,24	0,1508	0,0101	1,7332	0,1162	14,9	
14. I. »	1500	1,014	sauer	7,5	12,14	0,1776	0,0099	2,2398	0,1247	17,9	
15. I. »	1500	1,011	sauer	6,75	12,00	0,1552	0,0077	1,9555	0,1080	20,2	20 gr. Ricinusöl, 8 Stühle.
16. I. »	1200	1,013	sauer	5,75	7,44	0,1491	0,0067	1,491	0,0670	22,3	
17. I. »	2600	1,013	stark sauer	6,0	8,42	0,1498	0,00915	1,6328	0,0991	16,3	
18. I. »					8,42			1,6328	0,0991	16,3	20 gr. Ricinusöl, 7 Stühle.
19. I. »	1250	1,014	stark sauer	6,25	8,43	0,1732	0,0078	1,8186	0,0819	22,2	
20. I. »	1000	1,014	stark sauer	—	—	0,16075	0,0075	1,3499	0,0630	21,4	
Mittel aus 10 Kefyr-tagen.					8,95						Entspricht einer durchschnittlich tägl. Ausscheidung von 3,42 gr. Homogentisinsäure.

II. Ueber die Alkaptonausscheidung bei Darreichung von Kefyr und nach dem Gebrauch von Ricinusöl.

(Siehe Tabelle 7 auf Seite 322.)

Unter weit günstigeren äusseren Bedingungen, als die Terpentinversuche, konnten die übrigen unter denselben Gesichtspunkten in Angriff genommenen Untersuchungen durchgeführt werden, als die Alkaptonpatientin durch die Güte des Herrn Geh. Rath Prof. Dr. Bäumler Aufnahme in das klinische Hospital gefunden hatte. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 7 zusammengestellt. — Auf der durch Rovighi und Andere festgestellten Thatsache fussend, dass bei der Zufuhr von Kefyr eine bedeutende Herabminderung der Darmfäulniss eintritt[1]), untersuchten wir, ob bei dem Gebrauche desselben Mittels eine Verminderung der Alkaptonausscheidung zu constatiren sei. Während der Dauer des Versuches — Pat. nahm täglich etwa 1 Liter Kefyr zu sich — wurde die Darmfäulniss durch fortlaufende Schwefelsäurebestimmungen im Harn controlirt. Dabei konnten wir an unserem Falle die fäulnisshemmende Wirkung des Kefyrs in schlagender Weise bestätigen, wie ein Blick auf Reihe 10 und 11 der Tabelle 7 zeigt. Wir haben zum Vergleich die Schwefelsäureausscheidung der Alkaptonpatientin unter normalen Ernährungsverhältnissen in Tabelle 8 dargestellt. Be-

Tabelle VIII.

Datum.	Menge.	Schwefelsäure in 50 cbcm. Harn als $BaSO_4$.		Schwefelsäure in der Tagesmenge als H_2SO_4.		$\frac{A}{B}$
		A.	B.	A.	B.	
18. XI. 91.	1100	0,22715	0,01415	2,0893	0,1306	16,1
19. XI. 91.	1200	0,1773	0,0145	1,7907	0,1465	12,2
24. XI. 91.	1040	0,1842	0,0116	1,5825	0,1009	15,8

[1]) Dass Milchdiät ebenfalls in dieser Richtung wirkt, geht aus den interessanten Versuchen von Winternitz (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 16, S. 460) hervor. Vergl. auch Schmitz, ebendas., Bd. 17, S. 401, und Biernacki, deutsches Archiv für klin. Medicin, Bd. II, 1. Heft.

Tabelle IX.

Mittlere Tagesmengen der Aetherschwefelsäuren in gr. H_2SO_4.	
Unter normalen Verhältnissen. Tab. 8.	Bei Kefyrdarreichg. Tab. 7.
0,1260	0,0942

sonders deutlich tritt die Wirkung des Kefyrs zu Tage, wenn man, wie dies in Tabelle 9 geschehen ist, die durchschnittlichen Tagesmengen der gebundenen Schwefelsäure mit einander vergleicht. Während nun die Eiweiss fäulniss unter dem Kefyrgebrauche dauernd beschränkt erschien, lief, wie Reihe 5 und 6 der Tabelle 7 zeigen, der durch die Stationen Eiweiss — Tyrosin — Homogentisinsäure gekennzeichnete Process in unverminderter Intensität fort. Es ergibt sich sogar bei der Berechnung der durchschnittlichen Tagesmenge des ausgeschiedenen Alkaptons ein geringes Plus gegenüber der in Tabelle 1 berechneten Durchschnittsmenge unter gewöhnlichen Verhältnissen — (3,42 gr. — 3,20 gr.).

Wir reihen gleich die Besprechung der Verhältnisse nach Darreichung von Ricinusöl an, deren zahlenmässige Darstellung ebenfalls auf Tabelle 7 Platz gefunden hat. Die Darreichung des Abführmittels geschah in doppelter Absicht: Einmal konnte man bei der durch das Mittel hervorgerufenen Beschleunigung der Peristaltik hoffen, Homogentisinsäure in den Fäces, in welchen sie bis dahin stets vermisst wurde, nachzuweisen und so ihre Entstehung im Darme ad oculos zu demonstriren. Andrerseits durfte man, weil eine Resorption der Homogentisinsäure nur in den oberen Darmabschnitten stattfindet (Wolkow und Baumann), erwarten, dass bei der raschen Fortbewegung des Darminhalts soviel Alkapton der Resorption entzogen werde, dass der Harn nachweisbar daran verarmte. Die in Tabelle 7 ersichtlichen Zahlen täuschten die gehegte Erwartung. Zwar trat bei dem ersten Oelversuche ein Rückgang der am Tage zuvor abnorm hohen Reductionszahl ein; doch bewegte sich derselbe nur ganz unerheblich unter die durchschnittliche Höhe hinunter. Beim zweiten Versuch blieb nach der Oel-

gabe der Reductionswerth auf derselben mittleren Höbe, die er am Tage zuvor inne hatte. Ein Einfluss des Abführmittels, dessen kräftige Wirkung aus den in der Tabelle verzeichneten Daten hervorgeht, ist somit nicht zu constatiren.

Ebenso ergab die Untersuchung der Stühle nach der oben erwähnten Methode ein negatives Resultat.

Wir fassen das Ergebniss der im vorstehenden Abschnitte mitgetheilten Versuche in den Satz zusammen, dass es nicht gelungen ist, durch Mittel, welche die Fäulniss- und Gährungsprocesse im Darme beschränken, die Alkaptonausscheidung herabzusetzen. Wir haben also den angestrebten Beweis nicht zu erbringen vermocht, dass die Homogentisinsäure im Darme gebildet wird. Der Ausfall des Kefyrversuchs mit seiner bedeutenden Beschränkung der Fäulnissprocesse bei constant bleibender Alkaptonausscheidung könnte im Gegentheil bei oberflächlicher Betrachtung als Beweis gegen die Entstehung der Homogentisinsäure durch pilzliche Lebensprocesse angesehen werden. Die Unzulässigkeit dieser Deutung der Thatsachen ergibt sich daraus, dass wir von vorneherein gar nicht beurtheilen können, wie der Kefyr auf die hypothetischen Organismen und ihre specifische Thätigkeit einwirkt. Der Kefyr stellt ja durchaus nicht ein «Antisepticum» im Sinne der Bacteriologen und Chirurgen dar, welches ohne Wahl alle Mikroorganismen des Darms vernichtet, oder auch nur alle in ihren Lebensprocessen beeinträchtigt. Nur für die eigentlichen, mit Phenol- und Indolbildung einhergehenden Fäulnissprocesse ist eine solche Wirkung des Kefyrs nachgewiesen. Der ganze Kefyrversuch ergibt mit Sicherheit also nur die vollständige Unabhängigkeit der Alkaptonbildung von den Fäulnissprocessen, wie sie durch andere Thatsachen schon wahrscheinlich gemacht war.

Eher könnte man versucht sein, die Ergebnisse des Ricinusölversuchs gegen die Richtigkeit der Hypothese von Wolkow und Baumann anzuführen. Zwar ist das Fehlen der Homogentisinsäure in den Stühlen durch die von Wolkow

und Baumann nachgewiesene Zersetzung des Alkaptons in den unteren Darmabschnitten zur Genüge erklärt. Dagegen erscheint es nach den oben angeführten Ueberlegungen sehr auffällig, dass keine Verminderung der im Harne ausgeschiedenen Menge zu constatiren war. Einige Aufklärung in dieser Richtung gibt die bemerkenswerthe Thatsache, dass wir nach beiden Oelgaben eine Verminderung der Aetherschwefelsäuren des Harns eintreten sahen. (Morax und Bartoschewitsch fanden dagegen beim Gesunden nach Ricinusöl eine Verkleinerung des Quotienten A/B.) Da nun die bei der Darmfäulniss entstehenden Zersetzungsproducte der Homogentisinsäure (Toluhydrochinon, Wolkow und Baumann) mit Schwefelsäure gepaart im Urin auftreten, so kann man aus unseren Zahlen mit Sicherheit folgern, dass bei dem Oelversuche grössere Mengen von Homogentisinsäure jedenfalls nicht der Fäulniss anheimgefallen sind. Damit wird dem in Rede stehenden Versuche eine strikte Beweiskraft, in der uns interessirenden Richtung, genommen.

Ueber das Verhalten der Homogentisinsäure im Organismus der Frau bei Darreichung derselben per os.

Tabelle X.

Datum.	Menge	Spec. Gew.	Reaction.	Reduction: in cbcm. $^{1}/_{10}$ Norm.-Ag-Lösg. für 10 cbcm. Harn.	Reduction: berechnet in gr. Ag für die Tagesmenge.	Schwefelsäure als $BaSO_4$ in 50 cbcm. Harn. A.	Schwefelsäure als $BaSO_4$ in 50 cbcm. Harn. B.	A/B	Bemerkungen
27. I. 92	—	—	—	—	—	—	—	—	Im Laufe des Tages 10, Homogentisinsäure.
28. I. 92.	1528	1,014	stark sauer	10,5	17,27	0,1292	0,0111	11,6	
29. I. 92.	1500	1,013	stark sauer	9,75	15,7	—	—	—	
30. I. 92.	1600	1,010	stark sauer	4,75	8,20	—	—	—	

Tabelle XI.

	Reductionswerth von 2 Tagesmengen in gr. Ag.	Reductionswerth von 2 Tagesmengen berechnet in gr. Homogentisins.
Unter normalen Verhältnissen durchschnittlich	16,78	6,40
Beobachtet nach Einfuhr von 10 gr. Alkapton.	32,97	13,9
Mehrausscheidung nach Einfuhr von 10 gr. Homogentisins.	—	7,50

Die Frau erhielt im Laufe eines Tages 10 gr. Homogentisinsäure, welche mit viel Zucker in ca. 1500 cbcm. Wasser gelöst war. Sie nahm die Säure in häufigen kleinen Quantitäten zu sich, womit eine Nachahmung der unter natürlichen Verhältnissen sich vollziehenden stetigen Bildung der Substanz bezweckt wurde. Das Resultat des Versuchs geht aus Tabelle 10 und 11 deutlich hervor: es wurden 75 % der eingeführten Säure wieder ausgeschieden. Der Rest scheint, wie die Aetherschwefelsäurebestimmung ergibt, welche normale Werthe zeigt, nicht durch die Darmfäulniss, sondern durch die Oxydationsprocesse in den Geweben zerstört worden zu sein. — Der Verlauf des Versuches lässt kein Moment erkennen, das in einem Widerspruch mit der Hypothese von Wolkow und Baumann stände.

Ueber den Harnsäuregehalt des Alkaptonharns.

Tabelle XII.

Datum.	Menge.	Spec. Gew.	Reaction.	Harnsäure. Gewogen in 200 cbcm. Harn in gr.	Harnsäure. Berechnet auf die Tagesmenge in gr.
15. I. 92.	1500	1,011	sauer	0,005	0,0375
16. I. 92.	1200	1,013	sauer	0,0095	0,0570
17. I. 92.	2600	1,013	stark sauer	0,0098	0,0637
18. I. 92.					0,0637
19. I. 92.	1250	1,014	stark sauer	0,004	0,0248

Schon Wolkow und Baumann war der Umstand aufgefallen, dass beim Ansäuren des Urins, zwecks Darstellung

der Homogentisinsäure, niemals Harnsäurekrystalle ausfielen[1]. Diese Beobachtung, sowie die Angabe von Mörner, dass die Harnsäure bei der Reductionsbestimmung Fehler verursache, wurden zum Ausgangspunkt unserer Versuche. In der ersten Mittheilung wurde bereits erwähnt, dass durch Salzsäure im Alkaptonharn niemals eine Ausfällung von Harnsäure erzielt wurde, wogegen deren Abscheidung aus normalem Urin, welchem Homogentisinsäure oder Alkaptonharn zugesetzt wurde, in normaler Weise vor sich ging. Um zu untersuchen, ob überhaupt Harnsäure im Alkaptonharn vorhanden sei, wurden 200 cbcm. des Harns eingedampft und mit absolutem Alkohol extrahirt (3 Mal). Der Rückstand, mit verdünnter Salzsäure digerirt und 24 Stunden stehen gelassen, zeigte mikroskopische Nadeln und gab die Murexidreaction. Es war also Harnsäure in dem Harn vorhanden. — Es gelang, dieselbe nach den Fokker'schen Verfahren, mit den oben erwähnten Vorsichtsmassregeln quantitativ zu bestimmen. Dass die dabei gewogene Substanz Harnsäure sei, wurde durch die Murexidprobe bestätigt, ihre Reinheit von anorganischen Verunreinigungen durch die Veraschung sichergestellt. Die gewonnenen Resultate sind in Tabelle 12 zusammengestellt: ein Blick auf dieselbe ergibt die abnorm niedrige Harnsäureausscheidung der Alkaptonpatientin. Allerdings sind die Zahlen ohne die von Salkowski eingeführte Correctur (0,03 gr. auf 200 cbcm. Harn) berechnet worden. Es erschien uns nämlich unrationell, eine Correctur anzubringen, deren Werth den beobachteten um das 5- bis 10fache überstieg. Nimmt man an, dass in Folge dieser Vernachlässigung eines Mangels der Methode unsere Zahlen selbst 50 % zu niedrig sind, so resultiren noch immer ganz abnorm geringe Werthe. — Eine Erklärung dieser Thatsache vermögen wir nicht zu geben.

Ueber das Verhalten der Homogentisinsäure im normalen menschlichen Organismus.

Die hier kurz zu schildernden Versuche wurden besonders in der Absicht unternommen, einen eventuellen Zusammenhang

---

[1]) S. Baumann, l. c.

zwischen der Homogentisinsäure- und der Harnsäureausscheidung zu constatiren. — In der That ergab sich ein Einfluss auf das Verhalten der Harnsäure im Harn, jedoch nicht in der erwarteten Art. — Ich nahm im Laufe von 24 Stunden in derselben Weise, wie es oben bei dem Versuch an der Alkaptonpatientin geschildert wurde, 4 gr. Homogentisinsäure zu mir; der Versuch wurde 2 Tage durchgeführt. — Die Untersuchung des Urins ergab an beiden Tagen dasselbe Resultat. Der Harn unterschied sich äusserlich nicht von der Norm, er zeigte insbesondere die normale helle Farbe. — Die Prüfung der Reductionsfähigkeit gab ein durchaus negatives Resultat; auch beim Ausschütteln des angesäuerten Harns mit Aether und Untersuchung des Extracts liess sich keine Spur von Homogentisinsäure nachweisen. Die Harnsäureausscheidung aus dem mit Salzsäure angesäuerten Harne fand in normaler Weise statt. Dagegen zeigte sich, dass bei der Ausführung der Fokker'schen Methode harnsaures Ammoniak in dem durch Soda alkalisch gemachten Harn durch Salmiak auch nicht in Spuren gebildet wurde. Das benutzte Filter zeigte vor und nach Ausführung des Versuchs das gleiche Gewicht. Diese Erscheinung wurde an beiden Tagen in durchaus gleicher Weise beobachtet. Es wurde nunmehr das alkalische Filtrat — d. h. der von Phosphaten befreite Harn — mit conc. Salzsäure stark angesäuert. Nach 24 Stunden war eine Harnsäureausscheidung nicht zu constatiren. Nunmehr wurde die saure Flüssigkeit eingedampft, die saure Reaction mit kohlensaurem Natron abgestumpft und warm filtrirt. Dann wurde wieder mit Salzsäure versetzt, worauf eine ziemlich reichliche bräunliche Fällung eintrat. Der krümelige Niederschlag abfiltrirt und mit Aetheralkohol gewaschen wurde weiss und gab die Murexidreaction. Das Filtrat wurde wieder mit kohlensaurem Natron alkalisch gemacht und mit Salmiak versetzt; es trat nunmehr ein Niederschlag auf, der sich als harnsaures Ammoniak erwies.

Wir können für das eben geschilderte Verhalten des Urins eine Erklärung einstweilen nicht geben und verzichten auf eine Erörterung der Möglichkeiten, bis weitere Thatsachen vorliegen. Sicher geht aus den mitgetheilten Versuchen hervor,

dass 4 gr. Homogentisinsäure, in den Darm des normalen Menschen gebracht, keine Alkaptonausscheidung im Urin bewirken. Man darf annehmen, dass die eingeführte Menge in den Geweben zerstört wird, wie dies bei dem Versuche an der Alkaptonpatientin erörtert wurde.

Dass bei Zufuhr grösserer Mengen des Alkaptons ein Theil desselben im Urin ausgeschieden wird, lehrte ein weiterer Selbstversuch. Ich nahm am 2. VIII. 92 Morgens 9½ Uhr 8 gr. Homogentisinsäure mit Zucker in ca. 1 L. Wasser gelöst, ohne die Säure zu neutralisiren. Um 11½ Uhr entleerte ich 250 cbcm. Harn, der alle Eigenschaften des Alkaptonharns zeigte. 10 cbcm. desselben reducirten 14,5 cbcm. der Zehntel-Normal-Silberlösung. Für die 250 cbcm. Harn berechnet sich somit ein Gehalt von 1,09 gr. Homogentisinsäure. Ein Theil des Harns wurde angesäuert, mit Aether ausgeschüttelt und das Bleisalz auf bekannte Weise dargestellt. Es schmolz bei 215°, ist also als reines homogentisinsaures Blei anzusehen. Der weitere Verlauf des Versuchs wurde leider dadurch gestört, dass sich bei mir ein unerträglicher Tenesmus, wahrscheinlich in Folge der stark sauren Reaction des Urins, entwickelte. Ich nahm deshalb mehrere Liter Wasser zu mir und konnte in dem weiterhin entleerten sehr verdünnten Urin auch nach dem Eindampfen keine Homogentisinsäure nachweisen. Die Harnsäureausscheidung konnte unter den geschilderten Verhältnissen nicht mit Erfolg untersucht werden. Nur wurde festgestellt, dass aus dem zuerst gelassenen Alkaptonharn durch Salzsäure eine ziemlich reichliche Harnsäurefällung bewirkt wurde.

Ueber das Verhalten der Homogentisinsäure beim Hunde nach subcutaner Injection.

(Siehe Tabelle 13 auf S. 331.)

Nachdem Wolkow und Baumann constatirt hatten, dass in den Darm eines Hundes eingeführte Homogentisinsäure grösstentheils in Toluhydrochinon und Kohlensäure gespalten werde, schien es zur Aufklärung über den Ort dieser Spaltung von Interesse, das Verhalten der Substanz bei sub-

Tabelle XIII.

Datum.	Tageszeit.	Menge.	Spec. Gew.	Reaction.	Reduction: in cbcm. $^1/_{10}$ Norm.-Ag-Lösg. für 10 cbcm. Harn.	Reduction: in gr. Ag. für die Tagesmenge.	Reduction: berechnet für Homogentisinsäure in gr.	Schwefelsäure als $BaSO_4$ in 50 cbcm. Harn. A.	Schwefelsäure als $BaSO_4$ in 50 cbcm. Harn. B.	Schwefelsäure als H_2SO_4 in der Tagesmenge. A.	Schwefelsäure als H_2SO_4 in der Tagesmenge. B.	$\frac{A}{B}$	Bemerkungen.
23. IX. 91.	—	—	—	—	—	—	—	—	--	—	—	—	Von heute ab erhält der Hund täglich ein Kilo Pferdefleisch.
26. IX. »	9 h. Morg.	710	1,040	schwach sauer	—	—	—	0,4764	0,0460	2,9060	0,2806	10,3	
27. IX. »	9 h. Morg.	670	1,038	schwach sauer	—	—	—	0,5049	0,0513	2,8274	0,2873	9,8	
28. IX. »	9 h. Morg.	576	1,046	alkalisch	—	—	—	0,6270	0,0670	3,0096	0,3216	9,4	12½ Uhr 5,65 gr. Homogentisinsäure subcutan.
28. IX. »	2³/₄ h. N.-M.	205	1,044	stark sauer	7,5			0,6311	0,0995			6,3	Harn reducirt Silberlösung in der Kälte nach etwa 2 Min.
						4,77	1,82			2,7254	0,4022		
29. IX. »	9 h. Morg.	384	1,047	stark sauer	7,5			0,5164	0,0728			7,1	$\frac{A}{B}$ = 6,8, Urin sehr dunkel. Reducirt nach ca. 1 Min.
30. IX. »	9 h. Morg.	470	1,045	stark sauer	—	—	—	0,6648	0,0496	2,6592	0,1984	13,4	Keine Reduction nachweisbar.
1. X. »	9 h. Morg.	470	1,040	stark sauer	—	—	—	0,6196	0,0768	2,4784	0,3072	8,0	
2. X. »	9 h. Morg.	624	1,043	sauer	—	—	—	0,6776	0,0539	3,5235	0,2803	12,6	

cutaner Einverleibung kennen zu lernen. Ueber den Verlauf des in dieser Richtung unternommenen Versuches s. Tab. 13. — Die Application der Säure wurde in der Weise vorgenommen, dass 10 gr. reines wasserhaltiges homogentisinsaures Blei in möglichst wenig Wasser zertheilt mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurden. Das Schwefelblei wurde abfiltrirt, das Filtrat durch einen Kohlensäurestrom vom Schwefelwasserstoff befreit und sorgfältig durch Eintragen von kohlensaurem Natron neutralisirt; die Lösung färbte sich beim Neutralisiren tiefbraun und hatte schliesslich ein Volum von ca. 20 cbcm. bei einem Gehalt von 5,65 gr. Homogentisinsäure. Die Lösung wurde dem Versuchshunde, einem kräftigen Thier von mittlerer Grösse, subcutan an verschiedenen Körperstellen beigebracht. Eine örtliche Reaction trat nicht ein, dagegen erschien das Allgemeinbefinden des Thiers in den nächsten Tagen etwas gestört zu sein; der sonst sehr lebhafte Hund lag missmuthig im Käfig und reagirte nicht wie sonst durch lebhafte Freudenbezeugungen beim Nahen seiner Wärter. Schon 2 Stunden nach der Einspritzung der Säure entleerte er einen Theil derselben mit dem Harn, der durchaus das Verhalten eines Alkaptonharns zeigte mit dem Unterschied, dass die Reduction der alkalischen Silberlösung erheblich langsamer erfolgte als im Harn der Alkaptonpatientin. — Der am folgenden Morgen vorgefundene Harn zeigte dieselben Eigenschaften wie der eben besprochene, nur dass die Reduction etwas rascher eintrat. Von da ab zeigte der Urin wieder sein gewöhnliches Verhalten. Der Hund hat sich also innerhalb 24 Stunden der Homogentisinsäure entledigt. Dass er dies nicht nur durch die Nieren gethan hat, zeigt einmal der Reductionswerth des Harns (entsprechend 1,82 gr. der Säure gegenüber 5,65 gr. eingeführter Substanz), sodann aber der Umstand, dass die auftretende Steigerung der Aetherschwefelsäureausscheidung zu gering ist, um einer den verschwundenen 3,83 gr. Säure entsprechenden Toluhydrochinonmenge äquivalent zu sein. Wir müssen vielmehr annehmen, dass ähnlich wie beim Menschen auch beim Hunde eine gewisse Menge der Homogentisinsäure in den Geweben zerstört worden ist. Die Steigerung der ge-

bundenen Schwefelsäure erreicht bei unserm Versuche nicht annähernd die excessiven Werthe, die Wolkow und Baumann bei ihrem Experimente fanden; die genannten Autoren dürften also mit Recht die Darmfäulniss für die von ihnen constatirte Spaltung im wesentlichen verantwortlich machen.

Wir weisen zum Schlusse unserer Arbeit nochmals darauf hin, dass die der Alkaptonurie zu Grunde liegenden anormalen Vorgänge weder ihrem Orte noch ihrer Aetiologie nach mit einiger Sicherheit ergründet sind. Wir haben zur Stütze der Hypothese von Wolkow und Baumann beweisende Thatsachen nicht beibringen können. Ebensowenig ist es uns gelungen, diese Hypothese zu widerlegen. Wir haben bei den betreffenden Versuchen jedesmal erörtert, warum jedem einzelnen derselben eine zwingende Beweiskraft gegen die Ansicht von Wolkow und Baumann nicht zukommt. Indessen wird man gestehen müssen, dass durch die Gesammtheit der negativ verlaufenen, auf Grund der Hypothese erdachten Versuche die Wahrscheinlichkeit der Bildung der Homogentisinsäure im Darmkanal erheblich vermindert ist. Die Entscheidung wird nur von weiteren Versuchen und Beobachtungen zu erwarten sein. Die von Garnier und Voirin[1]) ohne jede experimentelle Grundlage aufgestellte Ansicht, es handle sich bei der Umwandlung des Tyrosins in Homogentisinsäure um einen normalen Vorgang, der für gewöhnlich durch die Zersetzung der gebildeten Homogentisinsäure im Darm verborgen bleibe, nur bei excessiver Tyrosinbildung (bei den Alkaptonpatienten) zur Alkaptonurie führe, fördert unser Verständniss des in Rede stehenden Processes — eben der Umwandlung des Tyrosins zu Homogentisinsäure — in keinem Punkte. Ausserdem würde, die Richtigkeit der Hypothese von Garnier und Voirin vor-

---

[1]) Dass die Aetherschwefelsäuren nicht im Darm durch Vereinigung der Phenole mit den Sulfaten entstehen, erwähnen wir deshalb, weil unser Schweigen über diesen Punkt von Garnier und Voirin als Zustimmung zu ihrer gegentheiligen Ansicht aufgefasst werden könnte.

ausgesetzt, beim normalen Menschen nach Zuführ grösserer Tyrosinmengen Alkaptonurie auftreten müssen, was nicht der Fall ist.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. Baumann, danke ich auch an dieser Stelle herzlich für die vielfache Belehrung, die er mir in seinem Laboratorium hat zu Theil werden lassen, sowie insbesondere für das fördernde Interesse, welches er der vorstehenden Arbeit stets entgegengebracht hat.

Analyse zweier seltener Harnsteine.

Von

J. Horbaczewski.

(Der Redaction zugegangen am 19. Juli 1898.)

I. Fettconcrement.

Im Januar d. J. wurden vom Collegen Herrn Prof. Maydl bei einem 56 Jahre alten Manne durch hohen Blasenschnitt 5 Steine herausbefördert, die mir zur Untersuchung übermittelt wurden. Die Steine waren auffallend leicht, einer etwa von Bohnen-, zwei etwa von Erbsengrösse, nicht vollkommen abgerundet, etwas bröckelig, leicht zerdrückbar, jedoch knetbar, von grau-brauner Farbe und wogen zusammen nicht ganz 0,5 gr. Trotzdem die Menge des zur Disposition stehenden Materials eine ziemlich ungenügende war, wurde doch der Versuch unternommen, eine Analyse auszuführen, da es sich anscheinend um Urostealithen handelte, die nur äusserst selten vorkommen.

Zur Analyse wurden 0,40 gr. verwendet, die zunächst mit Aether vollständig extrahirt wurden. Dabei lösten sich die Steine bis auf ganz dünne, grau und braun gefärbte Hülsen auf, die die Form der Steine beibehielten, innen jedoch leer waren und nur graue und braune Septe und Krusten eingeschlossen hielten.

Dieser in Aether unlösliche Antheil der Steine wog 0,050 gr. = **12,5** % und bestand z. Th. aus anorganischen Stoffen, von denen CaO, MgO, Fe_2O_3, CO_2 und P_2O_5 nachgewiesen werden konnten, z. Th. aus organischen Verbindungen.

Zur Bestimmung der Menge der anorganischen S
0,0157 gr. Substanz verascht und es wurde 0,
0,8 % Asche erhalten.

Der organische Antheil der in Aether unlö
stanz betrug demnach **11,7** % des Steingewichtes.
war amorph, gab mit Millon'schem Reagens
mit Salpetersäure Xanthoproteïnreaction, bestand
aus Eiweiss oder Mucin, enthielt wahrscheinlich
farbstoff, der sich bei der mikroskopischen Unte
Form brauner Schollen kundgab und wofür au
wesenheit von Eisen in der Asche spricht.

Bei Behandlung der Krusten mit Salzsäure
mikroskopische, nadelförmige, in Wasser und ka
unlösliche, in Aether dagegen leicht lösliche K
Mit dem im Nachfolgenden mitgetheilten weite
zusammengenommen unterliegt es kaum einem Z
es sich um in Wasser unlösliche Seifen (Kalk- u
Verbindungen mit Fettsäuren) handelte, die dur
zerlegt wurden und freie Fettsäuren lieferten.

Die ätherische Lösung lieferte nach dem
des Aethers einen fast ganz farblosen, krystallini
stand, der nach dem Trocknen im Vacuum üb
säure 0,3400 gr. = **85,0** % des Steingewichtes

Dieser Rückstand wurde mit verdünnter
geschüttelt, in welcher sich ein Theil desselbe
eine stark schäumende Flüssigkeit lieferte, währe
ungelöst in der Flüssigkeit suspendirt blieb. Beim
der Flüssigkeit mit Aether löste sich der suspen
schlag sofort auf, während die wässerige Lösung
Stehen unter «Seifenleim»-Bildung erstarrte.

Nach dem Verdampfen der ätherischen Lö
ein aus Fett bestehender Rückstand erhalten, d
= **33,5** % wog. Aus der heissen Seifenlösung w
Schwefelsäure Fettsäuren abgeschieden, deren Me
0,2061 gr. = **51,5** % betrug.

Das Fett wurde mit alkoholischer Kalilauge
Seifenlösung nach dem Verjagen des Alkohols

ausgeschüttelt, die ätherische Lösung verdampft, wobei eine kleine Menge eines krystallinischen Rückstandes erhalten wurde. Derselbe wurde mit Wasser und kaltem Alkohol gewaschen, in Alkohol und Aether gelöst, die Lösung verdampft. Es krystallisirten farblose Plättchen aus, die mit Schwefelsäure und Jod die bekannte Cholesterin-Reaction gaben.

Aus der wässerigen Seifenlösung wurden durch Schwefelsäure in der Hitze Fettsäuren abgeschieden, abfiltrirt und die wässerige Lösung wurde noch in üblicher Weise auf Glycerin geprüft. Diese Prüfung führte zu keinem positiven Resultate, da die Menge der Substanz zu gering war.

Das aus dem Fett abgeschiedene Fettsäuregemisch hatte einen Schmelzpunkt von 52,5° C., während dasjenige aus der ursprünglichen (durch Schütteln des Aether-Rückstandes mit Soda erhaltenen) Seifenlösung abgeschiedene bei 55,5° C. schmolz.

Alle Fettsäuren wurden nun zusammen in Alkohol gelöst, die Lösung mit Soda versetzt, abgedampft, der bei 130° C. getrocknete Rückstand mit absolutem Alkohol extrahirt und die alkoholische Lösung mit einer alkoholischen Lösung von essigsaurem Baryt fractionirt gefällt.

A. Die erste grössere Fraction lieferte nach dem Zersetzen der Barytverbindungen mit Salzsäure etc. Fettsäuren, die bei 58,5—59° C. scmolzen.

B. Die zweite kleinere Fraction lieferte Fettsäuren vom Schwefelpunkte 53,5° C.

Die Fettsäuren der Fraction A. wurden wieder in Alkohol gelöst, nach dem Versetzen mit Sodalösung verdampft, der bei 130° C. getrocknete Rückstand in absolutem Alkohol aufgenommen und die Lösung wieder fractionirt mit alkoholischer Lösung von essigsaurem Baryt in 3 Fractionen gefällt.

Die erste ganz kleine Fraction wurde nicht untersucht.

Von der zweiten Fraction gaben 0,0599 gr. des bei 120° C. getrockneten Baryumsalzes 0,0199 gr. $BaSO_4$, entsprechend 0,0117 gr. Ba = **19,53%**.

Stearinsaurer Baryt enthält:	Gefunden:
19,49% Ba.	19,53% Ba.

Von der dritten Fraction gaben 0,0719 gr. Baryum-Verbindung, die bei 120° C. getrocknet wurde, 0,0260 gr. $BaSO_4$, entsprechend 0,01528 gr. Ba = **21,25 %**.

Palmitinsaures Baryt enthält:	Gefunden:
21,17 % Ba.	21,25 % Ba.

Die kleinere Fraction B. gestattete wegen zu geringer Menge keine Barytbestimmung mehr. Nach dem Schmelzpunkte (53,5° C.) zu urtheilen dürfte dieselbe Myristinsäure enthalten haben, die bei 53,8° C. schmilzt. Dass diese Fraction noch ein Gemische von wenig Stearinsäure und viel Palmitinsäure von dem besagten Schmelzpunkte enthalten hätte, ist nicht anzunehmen, da bereits die vorher abgeschiedene Fraction reinen palmitinsauren Baryt enthielt.

Die Steine enthielten demnach: Stearinsäure, Palmitinsäure und wahrscheinlich auch Myristinsäure, und ist die Zusammensetzung derselben folgende:

Wasser	2,5 %.
Anorganische Stoffe	0,8 »
Organische Stoffe in Aether unlöslich	11,7 »
[Darunter unlösliche CaO- und MgO-Seifen, wahrscheinlich etwas Blut, Eiweiss oder Mucin].	
Organische Stoffe in Aether löslich	85,0 »
Darunter: Freie Fettsäuren	51,5 »
Fette	33,5 »
Cholesterin	Spuren.

Die Fettsäuren bestanden aus einem Gemische von Stearinsäure, Palmitinsäure und wahrscheinlich Myristinsäure.

Von Heller, Moore und Vidau wurden Harnsteine beschrieben, die aus einer eigenthümlichen, fettartigen Substanz bestehen sollten und Urostealithen genannt wurden. Auch Kruckenberg analysirte einen Urostealithen, fand jedoch, dass derselbe aus Paraffin bestand, welches offenbar von einem Paraffinstabe abgebrochen war. Dieser Forscher hält auch die eben erwähnten Urostealithe für zufällig in die Blase hineingelangte Fremdstoffe: Siegellack, oder ähnliche Producte, resp. Paraffin und bezweifelt das Vorkommen von aus Fett bestehenden Blasenconcrementen, welche Ansicht auch andere Autoren theilen.

Im vorliegenden Falle handelt es sich um wirkliche Fettconcremente, die wohl kaum durch Zufall von Aussen in die Blase hineingelangen konnten, sondern sich hier bilden mussten. Der ganze Habitus der Concremente, die Zusammensetzung derselben, die Anwesenheit von Cholesterinspuren sprechen entschieden dafür. Auf Grund dieses Befundes kann man wohl nicht mehr zweifeln, dass Blasenconcremente, die aus Fett bestehen, vorkommen.

II. Cholesterinconcrement.

Vor einiger Zeit erhielt ich vom Collegen Herrn Prof. Maydl, über meine Bitte um Ueberlassung eines Cystinsteines, die Hälfte eines beträchtlich grossen, wenig gefärbten, krystallinischen, sich fettig anfühlenden Concrements, welches den grössten Umfang von 111 mm., die Länge von 65 mm. und eine Breite von 37 mm. hatte, im Ganzen 25,4 gr. wog und eine birnförmige Gestalt hatte. Dieses Concrement befand sich im Museum der böhmischen chirurgischen Klinik, war mit «Cystin» signirt und wurde vom verstorbenen Prof. Weisz im J. 1881 durch hohen Blasenschnitt bei einem 6jährigen Mädchen extrahirt, bei dem ein Jahr vorher ebenfalls durch Prof. Weisz ein Cystinstein durch hohen Blasenschnitt entfernt wurde.

Die Untersuchung dieses Steines, aus dem Cystin gewonnen werden sollte, ergab nun, dass derselbe gar kein Cystin enthielt, sondern aus Cholesterin bestand. Eine detaillirte mikro- und makroskopische Beschreibung dieses Steines wird Herr Dr. Kukula in seiner Monographie «Ueber Blasen-Lithiasis in Böhmen», die demnächst bei Šafař in Wien erscheinen wird, liefern. Ich beschränke mich daher nur auf die Mittheilung der chemischen Analyse.

4,0942 gr. Steinpulver wurden mit Aether extrahirt. Die ätherische Lösung lieferte nach dem Verdampfen des Aethers 3,9248 gr. eines weissen, krystallinischen Rückstandes, der aus fast reinem Cholesterin bestand. Derselbe wurde mit alkoholischer Kalilösung gekocht, die Flüssigkeit nach dem Verdampfen des Alkohols mit Aether ausgeschüttelt, lieferte schön

krystallisirtes Cholesterin, welches nach dem Umkrystallisiren aus Alkohol-Aether einen Schmelzpunkt von 145° C., sowie die Reactionen mit Schwefelsäure und Jod, mit Chloroform und Schwefelsäure, mit Chloroform, Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure, mit Salpetersäure und Ammoniak, sowie mit eisenchloridhaltiger Salzsäure zeigte, und dessen Lösung linksdrehend war.

Der Stein enthielt daher gewöhnliches Cholesterin. Die wässerige, alkalische Lösung wurde, um etwa vorhandene Fettsäuren abzuscheiden, mit Schwefelsäure in der Wärme angesäuert, schied aber nur so geringe Mengen derselben aus, dass eine nähere Untersuchung nicht möglich war.

Der in Aether unlösliche Steinantheil war von dunkelgelb-brauner Farbe, löste sich z. Th. in verdünnter Salzsäure unter Aufbrausen — enthielt demnach Carbonat. Die salzsaure Lösung enthielt Kalk und Phosphorsäure. Der in Salzsäure unlösliche Niederschlag bestand z. Th. aus Gallenfarbstoff, der durch Chloroform entzogen und nach allen charakteristischen Reactionen erkannt werden konnte, z. Th. aus einem auch in Alkohol unlöslichen, in Lauge löslichen Rückstande, der Eiweissreactionen gab und daher aus diesem oder Mucin bestand.

Zur Bestimmung des Wasser- und Aschengehaltes wurden 0,4887 gr. Steinpulver bei 110° C. getrocknet und lieferten 0,4718 gr. festen Rückstand, der nach dem Verbrennen 0,0027 gr. Asche zurückliess.

Die Zusammensetzung des Steines war daher folgende:

	Wasser	3,76 %.
	Anorganische Salze	0,55 »
	Organische Stoffe	95,99 »
Davon:		
	Cholesterin	95,87 »
	In Aether unlösliche organische Stoffe	0,15 »

Dieser Blasenstein schliesst sich an Concremente an, die von Ebstein, Mecarthy und Church beschrieben wurden, die auch Cholesterin enthielten, ist jedoch durch seine bedeutende Grösse besonders ausgezeichnet.

Ueber die Trennung der Harnsäure von den Xanthinbasen.

Von

J. Horbaczewski.

(Der Redaction zugegangen am 19. Juli 1893).

Bei dem Nachweise der Harnsäure in den Organen und Flüssigkeiten des Thierkörpers wird man, bei Anwendung der jetzt zur Isolirung der Harnsäure verwendeten Methode, der Fällung mit Silberlösung, kaum in die Lage kommen, ein Product zu erhalten, welches aus reiner Harnsäure bestehen würde — vielmehr wird dasselbe mit einer grösseren oder geringeren Menge der sog. Xanthinbasen, die stete Begleiter der Harnsäure sind, abgeschieden werden. Da das Hypoxanthin und das Kossel'sche Adenin in Säuren und Alkalien ziemlich leicht löslich sind, so ist die Gefahr einer Verunreinigung des als Harnsäure abgeschiedenen Productes mit diesen Basen nicht gegeben, da dieselben bei nachheriger Behandlung der durch Zersetzung des Silberniederschlags erhaltenen Lösung mit Salzsäure (oder Ammoniak) in Lösung bleiben. Anders verhält sich die Sache mit dem Xanthin und Guanin, die weniger leicht löslich sind, als die vorgenannten zwei Basen und die daher unter Umständen, namentlich wenn dieselben in grösserer Menge vorhanden sind, zur Verwechselung oder zur Verunreinigung der Harnsäure führen könnten.

Vor Kurzem haben A. Kossel[1]), sowie dessen Schüler Wulff[2]) den Umstand besonders hervorgehoben, dass beim

[1]) Verhandlungen der physiolog. Ges. zu Berlin 1892/93, Nr. 1.

[2]) Diese Zeitschr., Bd. 17, S. 634.

Nachweise der Harnsäure in den Organen eine be
merksamkeit der Trennung der Harnsäure vom
gewendet werden müsse, da das isolirte Product
verunreinigt sein könnte. Es ist jedoch klar, d
artigen Versuchen, namentlich wenn ganz frische C
sucht werden, nicht nur Xanthin, sondern auch
in Betracht gezogen werden muss, da man für
kaum in die Lage kommen wird, nur Xanthin al
Harnsäure zu trennen, weil auch das Guanin ei
gleiter der Harnsäure ist. Nur in denjenigen Fä
Organe bis zu einem gewissen Grade faulten,
Xanthin (neben Hypoxanthin), welches aus
durch Fäulniss entsteht, zu erwarten.

Eine Methode, welche die Harnsäure von
basen scharf zu trennen gestatten würde, exist
nicht. Wulff hat (l. c.) zwar eine Methode a
nach welcher man das Xanthin von der Harnsäu
wärmen mit verdünnter Salpetersäure trennen
die Harnsäure gänzlich zerstört wird, während
unverändert bleibt — es ist jedoch einleuchtend
Verfahren allein zum Nachweise der Harnsäure
wendet werden kann, weil der Umstand, dass d
säure angesprochene Niederschlag durch verdünn
säure zerstört wird, nicht ausreichend ist, die
Harnsäure festzustellen, da es doch zu gewagt wär
Verhalten allein auf die Anwesenheit von Harnsäure
wenn der als Harnsäure angesprochene Körper auc
lösung ausgefällt wurde. Das Verfahren von Wu
jedoch in einfacherer Weise als bisher das Xan
Harnsäure) nachzuweisen und kann daher mit V
wendet werden, um den Beweis zu erbringen, d
gegebenen Falle die aus einem Gemische von Ha
Xanthin abgetrennte Harnsäure wirklich völlig xa
nachdem die Identität derselben durch alle Reacti
gestellt wurde. Bevor man jedoch in die Lage
Reinheit der Harnsäure zu prüfen, muss dieselbe zu
werden und eine derartige Methode existirt, wie g

I. Trennung der Harnsäure vom Xanthin.

Anlässlich der Discussion der Frage, ob die bei meinen Versuchen über die Harnsäurebildung im Organismus[1]) erhaltene Harnsäure Xanthin enthalten haben konnte, welche Vermuthung von Kossel (l. c.), sowie von Wulff (l. c.) ausgesprochen wurde, wurde die Meinung geäussert, dass man gegebenen Falls versuchen könnte, die Harnsäure vom Xanthin entweder mit Salzsäure oder mit Ammoniak zu trennen[2]).

Einige in dieser Richtung angestellte Versuche ergaben nun, dass nach dem Ammoniak-Verfahren befriedigende Resultate kaum zu erzielen seien, da bei Gegenwart von Xanthin die Löslichkeit des Ammonurats bedeutend zunimmt, so dass man eine bedeutende Einbusse an Harnsäure erleidet. Als Beispiel mögen folgende Bestimmungen dienen:

Es wurden 0,1629 gr. Harnsäure und 0,1612 gr. Xanthin in wenig Lauge gelöst, mit Wasser auf 20 cbcm. verdünnt und die heisse Flüssigkeit mit 10 cbcm. Salmiaklösung versetzt. Nach 24stündigem Stehen wurde das abgeschiedene Ammonurat abfiltrirt und in der bei der Fokker'schen Methode der Harnsäurebestimmung üblichen Weise in freie Harnsäure umgewandelt. Dabei wurden 0,1375 gr. Harnsäure, d. i. um 0,0257 gr. weniger als die verwendete Menge, gefunden. Als bei einem anderen Versuche nur 0,0296 gr. Harnsäure mit 0,1488 gr. Xanthin in derselben Weise behandelt wurden, hatte sich auch nach 36 St. Stehen kein Ammonurat abgeschieden, sondern die Flüssigkeit blieb klar. Es ergibt sich daraus, dass die Abscheidung der Harnsäure aus Lösungen, die grössere Xanthinmengen enthalten, nach der Fokker'schen Methode nur eine ziemlich unvollständige sein kann und es wäre daher diese Methode in solchen Fällen überhaupt nicht zu verwenden.

Mehrere Versuche, bei denen die Trennung der Harnsäure vom Xanthin mittelst Salzsäure durchgeführt wurde, führten zu besseren Ergebnissen. Es zeigte sich jedoch, dass

---

[1]) Monatshefte f. Chemie, Juli 1889 und April 1891.

[2]) Du Bois-Reymond's Archiv 1893, S. 101.

auch bei dieser Trennung merkliche Verluste an Harnsäure resultiren, wie z. B. der folgende Versuch lehrt:

0,1619 gr. Harnsäure + 0,1585 gr. Xanthin wurden in wenig Lauge gelöst, die Lösung mit Wasser auf 60 cbcm. verdünnt und kochend heiss mit 5 cbcm. conc. Salzsäure gefällt. Nach $2^1/_2$stündigem Stehen wurde filtrirt etc. und es wurden 0,1758 gr. Harnsäure erhalten. Die Menge des Filtrats mit Waschwässern betrug 92 cbcm., die 0,0058 gr. Harnsäure in Lösung halten konnten, — es muss daher die Gesammtmenge der gefundenen Harnsäure zu 0,1516 gr. genommen werden, d. i. um 0,0103 gr. weniger, als die verwendete Menge. Bei anderen in derselben Weise nur mit wechselnden Flüssigkeitsmengen ausgeführten Versuchen wurden ähnliche Resultate erhalten, die in Anbetracht des Umstandes, dass man merkliche Verluste an Harnsäure erleidet, auch nicht ganz befriedigen können.

Aus diesem Grunde wurde noch ein anderes Trennungsmittel und zwar conc. Schwefelsäure versucht. Löst man nämlich das Xanthin in einer genügenden Menge conc. Schwefelsäure und verdünnt die Lösung mit der vierfachen Menge Wasser, so bleibt dieselbe auch nach längerem Stehen klar — es scheidet sich aus derselben kein Xanthin aus, während die Harnsäure bei gleicher Behandlung binnen kurzer Zeit ausfällt. Drei derartige Versuche ergaben folgende Resultate:

1. 0,1472 gr. Harnsäure + 0,1459 gr. Xanthin wurden in 5 cbcm. conc. Schwefelsäure unter gelindem Wärmen gelöst, die Lösung mit 20 cbcm. Wasser versetzt und 19 St. stehen gelassen. Die abgeschiedene Harnsäure wurde mit verdünnter Schwefelsäure, dann mit Wasser und Alkohol gewaschen, wog 0,1504 gr. = + 0,0032 gr.
2. 0,1234 gr. Harnsäure + 0,1304 gr. Xanthin wurden in derselben Weise behandelt, jedoch wurde die Harnsäure schon nach $4^1/_2$ Stunden abfiltrirt. Erhalten wurden 0,1156 gr. = — 0,0078 gr.
3. 0,1222 gr. Harnsäure + 0,1293 gr. Xanthin ebenso behandelt, die Harnsäure nach $5^1/_2$ Stunden filtrirt. Erhalten wurden 0,1208 gr. = — 0,0014 gr.

Diese Beobachtungen ergeben, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen nach 19stündigem Stehen aus der Lösung sich auch etwas Xanthin mit der Harnsäure ausscheidet, dass

dagegen diese letztere bereits nach 4—5 Stunden abgeschieden ist. Die Prüfung der gewogenen Harnsäure ergab, dass dieselbe im Versuche 1 merkliche Spuren von Xanthin enthielt und ferner dass merkwürdiger Weise die in den Versuchen 2 und 3 erhaltene zwar mit sehr geringen, aber doch nachweisbaren Spuren von Xanthin verunreinigt war. Dieser Umstand war der Grund, dass das ganze Verfahren dahin abgeändert wurde, dass die aus schwefelsaurer Lösung ausgeschiedene Harnsäure noch einmal in Lauge gelöst, die Lösung mit Salzsäure übersättigt, auf ein kleines Volum eingedampft und die erst nun abgeschiedene Harnsäure filtrirt und gewogen wurde. Bei diesem Vorgange erhält man die Harnsäure rein (xanthinfrei) und erleidet keine grösseren Verluste. (Dabei wird auch ein kleiner Missstand vermieden, nämlich dass die aus schwefelsaurer Lösung abgeschiedene Harnsäure in der Regel an die Gefässwände so ankrystallisirt, dass das Entfernen derselben einige Schwierigkeiten bereitet, während das nach Ausscheidung aus der mit Salzsäure angesäuerten Lösung nicht der Fall ist). Es wurde daher bei den folgenden Versuchen wie folgt verfahren: Harnsäure und Xanthin wurden bei 110° C. getrocknet, gewogen, in einem Platinschälchen in reiner conc. Schwefelsäure, von der auf je 0,1 gr. Substanz 2 cbcm. verwendet wurden, unter gelindem Erwärmen gelöst und die Lösung mit der 4fachen Menge Wasser versetzt. Nach fleissigem Rühren, bis sich die Harnsäure reichlich abzuscheiden begann, wurde die Flüssigkeit 3—6 Stunden stehen gelassen. Nachher wurde die ausgeschiedene Harnsäure auf ein ganz kleines Filterchen gebracht, zunächst mit schwefesäurehaltigem Wasser, dann mit Wasser allein gewaschen, der Niederschlag abermals (in demselben Schälchen, aus welchem demnach die Harnsäure nicht vollständig entfernt werden muss) in wenig reiner Natronlauge (e natrio) gelöst, mit Salssäure stark angesäuert und auf einige cbcm. verdampft. Nach 1stündigem Stehen wurde durch ein Ludwig'sches Glaswollfilter filtrirt, mit salzsäurehaltigem Wasser, dann mit Wasser, schliesslich mit Alkohol und Aether gewaschen, bei 110° C. getrocknet und gewogen.

In dieser Weise wurden 15 Versuche ausgeführt, deren Resultate in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt sind.

In der Tabelle sind angeführt: Menge der verwendeten Harnsäure und des Xanthins, ferner Menge des Filtrats mit den Waschwässern, die hier nothwendigerweise grösser ausfallen muss und daher merkliche Harnsäuremengen in Lösung hält. Diese in Lösung bleibenden Harnsäuremengen wurden unter Zugrundelegung der Lösungsverhältnisse der Harnsäure 1:16,000 Wasser berechnet und dann als Correctur zu der gewogenen Harnsäure hinzuaddirt. In der letzten Rubrik ist die Differenz zwischen der so gefundenen und verwendeten Harnsäure-Menge angegeben.

Versuchs-No.	Die beim Versuche verwendete Menge von Harnsäure gr.	Die beim Versuche verwendete Menge von Xanthin gr.	Verwendete conc. Schwefelsäure cbcm.	Menge des Filtrats sammt Waschwässern cbcm.	Harnsäure. Gewogen. gr.	Harnsäure. im Filtrat gelöst (Correctur). gr.	Gesammt-Harnsäure. gr.	Differenz. gr.
1.	0,1210	0,1297	5	77	0,1112	0,0048	0,1160	— 0,0050
2.	0,1174	0,1209	5	68	0,1120	0,0040	0,1160	— 0,0014
3.	0,1265	0,1231	5	68	0,1175	0,0040	0,1215	— 0,0050
4.	0,1211	0,1231	5	57	0,1183	0,0034	0,1217	+ 0,0006
5.	0,1258	0,1231	5	65	0,1170	0,0040	0,1210	— 0,0048
6.	0,0340	0,1249	3	50	0,0268	0,0030	0,0298	— 0,0042
7.	0,0325	0,1186	3	53	0,0244	0,0032	0,0276	— 0,0049
8.	0,0822	0,1141	4	64	0,0753	0,0038	0,0791	— 0,0031
9.	0,0882	0,1236	4	60	0,0806	0,0036	0,0842	— 0,0040
10.	0,1323	0,0273	4	76	0,1272	0,0045	0,1317	— 0,0006
11.	0,1325	0,0407	4	71	0,1263	0,0043	0,1306	— 0,0019
12.	0,1291	0,1180	5	73	0,1200	0,0045	0,1245	— 0,0046
13.	0,1232	0,1252	5	70	0,1141	0,0042	0,1183	— 0,0049
14.	0,1346	0,1167	5	65	0,1265	0,0040	0,1305	— 0,0041
15.	0,1410	0,1321	5	77	0,1342	0,0048	0,1390	— 0,0020

Wie aus den mitgetheilten Resultaten hervorgeht, ist die gefundene Harnsäuremenge, mit Ausnahme des Versuches Nr. 4, der fehlerhaft ist, auch nach Hinzurechnung der Correctur constant etwas kleiner, als die angewandte (die grösste Differenz beträgt 0,0050 gr.).

Es war denkbar, dass dieses kleine Minus dadurch bedingt ist, dass sich in den stark sauren Flüssigkeiten etwas mehr

Harnsäure löst, als im Wasser. Zwei nachfolgende Versuche zeigen jedoch, dass das nicht der Fall ist.

0,1256 gr. Harnsäure wurden in 5 cbcm. conc. Schwefelsäure gelöst, mit 20 cbcm. Wasser versetzt, die abgeschiedene Harnsäure nach 3 St. filtrirt, mit schwefelsäurehaltigem Wasser, dann mit Wasser gewaschen, nachher in Lauge gelöst, mit Salzsäure übersättigt, eingedampft, nach 1 St. filtrirt, mit salzsäurehaltigem Wasser, dann mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen, getrocknet und gewogen. Es wurden 0,1220 gr. Harnsäure erhalten. Da die Menge des Filtrats sammt Waschwässern 70 cbcm. betrug, so müssen noch als Correctur 0,0042 gr. hinzuaddirt werden. Es ergeben sich demnach im Ganzen 0,1262 gr. = + 0,0006 gr. Harnsäure.

Beim zweiten, in ganz ähnlicher Weise angestellten Versuche wurden 0,1305 gr. verwendet und 0,1306 gr. (mit Correctur) gefunden = + 0,0001 gr.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass auch in ziemlich starken Säuren sich nicht mehr Harnsäure löst, als im Wasser. Es kann demnach der Grund dessen, dass bei den Trennungsversuchen constant etwas weniger Harnsäure gefunden wurde, nur in dem Beisein des Xanthins liegen, welches offenbar die Löslichkeit der Harnsäure in geringem Grade steigert. Es wäre daher bei der Fällung der Harnsäure mit Säure aus Lösungen, die Xanthin enthalten, noch eine Correctur anzubringen, die sich nach den vorstehenden Versuchen für je 100 mgr. Xanthin zu 3,2 mgr. berechnet, die zu der gefundenen Harnsäure hinzuzuaddiren sind. Ist die Xanthinmenge gering, so ist eine solche Correctur überflüssig.

Nach dem mitgetheilten Verfahren erhält man demnach ganz befriedigende Resultate der Trennung der Harnsäure vom Xanthin. Die geringe Menge von Harnsäure, die mit dem Xanthin in Lösung bleibt, genirt dann bei der Xanthinbestimmung nicht viel. Die Silberverbindung des Xanthins, die aus dem ammoniakalisch gemachten Filtrate abgeschieden wird, wird in üblicher Weise mit Salpetersäure behandelt und dabei werden diese Harnsäurespuren sofort zerstört, oder es kann aus dem mit Ammoniak neutralisirten Filtrate das

Xanthin mit Essigsäure abgeschieden und nach **Wulff** mit verd. Salpetersäure behandelt werden, um die Harnsäure zu zerstören.

Die bei den vorstehenden Versuchen abgeschiedene Harnsäure wurde in jedem einzelnen Falle auf ihre Reinheit, bzw. ob sie nicht Xanthin enthält, geprüft. Mit Ausnahme des Versuchs Nr. 4, bei welchem Spuren von Xanthin nachgewiesen wurden, erwies sich dieselbe bei Anwendung des oben erwähnten Verfahrens von **Wulff** als rein.

Der Grund, dass die Harnsäure im Versuche Nr. 4 mit Spuren von Xanthin verunreinigt war, liegt darin, dass bei diesem Versuche der Harnsäureniederschlag absichtlich sehr wenig gewaschen wurde. Beim Auswaschen desselben kommt man übrigens mit ziemlich wenig Flüssigkeit aus — wie aus den vorstehenden Angaben hervorgeht — man muss nur beim jedesmaligen Waschen wenig Flüssigkeit anwenden, dasselbe jedoch recht viele Male wiederholen.

II. Trennung der Harnsäure vom Guanin.

Die Trennung der Harnsäure vom Guanin wurde in ganz derselben Weise wie diejenige vom Xanthin durchgeführt. In Betreff der Details der Ausführung wird daher auf das im Vorstehenden Mitgetheilte verwiesen. Die erhaltenen Resultate sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt:

Versuchs-No.	Die beim Versuche verwendete Menge von		Verwendete conc. Schwefelsäure cbcm.	Menge des Filtrats sammt Waschwässern cbcm.	Harnsäure		Gesammt-Harnsäure	Differenz
	Harnsäure gr.	Guanin. gr.			Gewogen. gr.	im Filtrat gelöst (Correctur). gr.	gr.	gr.
1.	0,1175	0,1058	5	75	0,1140	0,0045	0,1185	+ 0,0010
2.	0,1223	0,1139	5	75	0,1196	0,0045	0,1241	+ 0,0018
3.	0,1138	0,1224	5	60	0,1102	0,0036	0,1138	+ — 0
4.	0,1397	0,0539	4	66	0,1360	0,0039	0,1399	+ 0,0002
5.	0,1282	0,0525	4	64	0,1246	0,0038	0,1284	+ 0,0002
6.	0,0528	0,1454	4,5	64	0,0504	0,0038	0,0542	+ 0,0014
7.	0,0494	0,1371	4,5	60	0,0459	0,0036	0,0495	+ 0,0001

Aus den mitgetheilten Resultaten ergibt sich, dass auf diese Weise die Harnsäure auch vom Guanin anstandslos getrennt werden kann. Da die Filtratmenge (+ Waschwässer) grösser ist, muss auch hier entsprechend der Menge des Filtrats eine Correctur der gewogenen Harnsäuremenge vorgenommen werden.

Diese erhaltenen Resultate zeigen nur insofern ein anderes Verhalten, als durch das Guanin die Löslichkeit der Harnsäure nicht gesteigert wird, was das Xanthin in geringem Grade doch bewirkt. Bei diesen Versuchen ergibt sich meistens ein geringes Plus an gefundener Harnsäure, welches offenbar nur davon herrührt, dass die Correcturen nicht ganz entsprechend sein dürften — wahrscheinlich löst sich beim Auswaschen der Harnsäure etwas weniger von derselben, als wenn dieselbe mit der Flüssigkeit durch längere Zeit in Berührung bleibt, oder aus einer Lösung auskrystallisirt.

Die nach der Trennung erhaltene Harnsäure wurde in jedem einzelnen Falle auf ihre Reinheit, bzw. auf den möglichen Guaningehalt geprüft. Man könnte dabei in dieser Weise vorgehen, dass man die Lösung derselben mit Silberlösung fällen und den Niederschlag in Salpetersäure in üblicher Weise lösen würde. Die hierauf ammoniakalisch gemachte Lösung müsste dann einen Niederschlag von Guaninsilber ausscheiden, falls der Harnsäure Guanin beigemischt wäre, denn die Harnsäureverbindung des Silbers wird durch Salpetersäure zerstört. In den vorliegenden Versuchen wurde die isolirte Harnsäure mit verdünnter Salpetersäure (5 : 100) erwärmt, wie es Wulff zum Nachweise des Xanthins that. Auch sehr geringe Guaninmengen, die der Harnsäure beigemischt sind, können auf diese Weise nachgewiesen werden, da die mit Ammoniak neutralisirte salpetersaure Lösung mit ammoniakalischer Silberlösung eine Fällung, oder wenigstens eine Trübung gibt, auch wenn nur Spuren von Guanin zugegen sind, wie folgende Versuche zeigen:

0,1200 gr. Harnsäure + 0,0025 gr. Guanin wurden mit 10 cbcm. verdünnter Salpetersäure (nach Wulff) behandelt. Mit Silberlösung entstand sofort ein flockiger Niederschlag.

0,1100 gr. Harnsäure + 0,0020 gr. Guanin in derselben Weise behandelt lieferten dasselbe Resultat.

0,1310 gr. Harnsäure + 0,0005 gr. Guanin in derselben Weise behandelt gaben mit ammon. Silberlösung eine deutliche Trübung.

Die in den obigen Versuchen isolirte Harnsäure erwies sich in allen Fällen als rein.

Ueber die Fällbarkeit der Harnsäure und der Basen der Harnsäuregruppe als Kupferoxydulverbindungen.

Von

Martin Krüger.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 21. Juli 1898.)

In Band 25, S. 2454 der Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft hat E. Drechsel eine kurze Mittheilung «Ueber eine neue Reaction gewisser Xanthinkörper» veröffentlicht, nach der Xanthin, Guanin und Hypoxanthin, ebenso wie Harnsäure aus ammoniakalischer Lösung durch Kupferchlorür oder aus fix-alkalischer mit Fehling'scher Lösung versetzter Lösung auf Zusatz reducirender Reagentien in Form schwer löslicher Kupferoxydulverbindungen gefällt werden, welche sich den Silberverbindungen der betreffenden Körper in ihren Eigenschaften sehr ähnlich verhalten.

Schon seit längerer Zeit mit der Untersuchung des Adenins und Hypoxanthins beschäftigt, habe ich in Anbetracht der Wichtigkeit der genannten Reaction für die Gewinnung des Adenins nach der Veröffentlichung der erwähnten Mittheilung auch Adenin auf sein Verhalten zu den gleichen Reagentien geprüft und die Fällbarkeit desselben constatiren können. Von einer näheren Untersuchung der genannten Reaction musste Abstand genommen werden, da Drechsel weitere Mittheilungen von Seiten F. Balke's in Aussicht stellte.

Balke[1]) fand nun, dass ausser den genannten Basen der Harnsäuregruppe noch Heteroxanthin, Paraxanthin, Carnin

[1]) Journ. f. pract. Chem., Bd. 47, S. 537—567.

und Adenin gefällt werden, nicht aber Theobromin u
Als Reductionsmittel der Kupferoxydlösungen
Hydroxylamin oder Dextrose an. Bezüglich des A
Hypoxanthins hat er nur kurz die Fällbarkeit derselb
und die Beschaffenheit der Niederschläge beschrie

Da zur Darstellung des Adenins aus dem d
netsten Material, dem Theeextract, bisher immer
niakalische Silberlösung angewendet worden war,
falls die Fällbarkeit des Adenins als Kupferoxydul
sich als eine quantitative erwies, die Gewinnung d
und damit des Hypoxanthins sich bedeutend billige
Es wurden zunächst einige Versuche gemacht, um
und Brauchbarkeit der genannten Reaction bei A
Hypoxanthin zu zeigen.

Als Fällungsmittel wandte ich Kupfersulfat plu
bisulfit an; dies Reagens gewährt den Vortheil, dass
der Basen sowohl in neutraler, als saurer und
Lösung vorgenommen werden kann.

Eine wässerige Lösung von Adenin oder seine
sauren Salzes wird durch Kupfersulfat und Nat
sofort als gelatinöser, farbloser Niederschlag gefäll
färbt sich an der Luft allmälig gelbgrün bis brä
beim Trocknen wird er dunkelgrün. Hypoxanthin
gleichen Umständen mehr flockig weiss.

Die Niederschläge lösen sich leicht in Mineral
schnellsten in Salpetersäure, langsam in heisser
sie werden durch Natronlauge nicht zersetzt, löse
Zusatz von Ammoniak in Berührung mit Luft
Durch Alkalisulfide werden sie leicht zersetzt.

Die Filtrate von den Kupferoxydulniederschlä
nicht mehr durch ammoniakalische Silberlösung g

Um die Schwerlöslichkeit dieser Kupferoxydulve
zu zeigen, wurden folgende quantitative Versuche

Je 0,1—0,2 gr. Adenin wurden in 200 cbc
auf Zusatz weniger Tropfen Schwefelsäure gelöst,
mit der 8fachen Menge des Adenins an Kupfers

dass auf 1 Molekül Adenin 4 Mol. Kupfersulfat kamen — und mit 5 resp. 10 cbcm. der käuflichen Natriumbisulfitlösung versetzt. Die entstandenen Niederschläge wurden nach wechselnden Zeiten abfiltrirt und im Filtrate das noch enthaltene Adenin nach der Kjeldahl'schen Methode bestimmt.

Wurde die Fällung des Adenins in der Kälte vorgenommen und der entstandene Niederschlag sofort abfiltrirt, so enthielt das Filtrat noch grössere Mengen Adenin, in einem Falle sogar 15,6 mgr. Nach 1stünd. Stehen war die Menge des gelöst gebliebenen Adenins bedeutend geringer; vollständig war die Fällung stets, wenn zwischen Fällung und Filtration ein Zeitraum von 12 Stunden verstrichen war.

Die Filtrate der sofort oder nach 1stünd. Stehen abfiltrirten Niederschläge trübten sich bei längerem Stehen, sofort beim Erhitzen. Dies schien darauf zu deuten, dass die Fällung des Adenins in der Wärme schneller und vollständiger vor sich geht, was durch den Versuch vollkommen bestätigt wurde.

Denn als 0,1070 gr. Adenin, wie oben, in 200 cbcm. Wasser plus wenig Schwefelsäure gelöst, mit 12 cbcm. 6,4proc. Kupfersulfatlösung und 3 cbcm. Natriumbisulfitlösung in der Wärme gefällt wurden, der entstandene Niederschlag sofort abfiltrirt und 2 Mal mit je 250 cbcm. heissen Wassers gewaschen wurde, blieben in den 3 Filtraten nur Spuren von Adenin zurück.

Dasselbe war der Fall, als 0,2052 gr. Adenin mit 25 cbcm. Kupfersulfatlösung und 10 cbcm. Natriumbisulfitlösung gefällt wurden. Im letzteren Falle betrug der auf gewogenem Filter gesammelte und bei 100° bis zum constanten Gewicht getrocknete Niederschlag 0,5044 gr. Er enthielt 2072 % N, 37,99 % Cu, 12,93 % SO_4. Da der Niederschlag 2 Mal mit je 250 cbcm. heissen Wassers ausgewaschen war, so ist nicht anzunehmen, dass die gefundene Schwefelsäure als Verunreinigung anzusehen ist; viel wahrscheinlicher scheint die Annahme zu sein, dass sie in die Kupferoxydulverbindung des Adenins eingetreten ist.

Das Verhältniss von Adenin zu Kupfer in dem analysirten Niederschlage ist genau gleich 1 : 2. Aus dem N-Gehalte des-

selben berechnet sich die Menge des wiedergefundenen Adenins zu 0,2015 gr. (an Stelle der angewandten Menge 0,2052 gr.); Verlust ist demnach 3,7 mgr. auf 750 cbcm. Wasser. Die Löslichkeit der Kupferoxydulverbindung des Adenins ergibt sich hieraus wie 1 in 200,000 Theile heissen Wassers.

Die Löslichkeit der Kupferoxydulverbindung von Hypoxanthin ist ebenso gering, wie die von Adenin. Aus 0,2042 gr. Hypoxanthin, welche wie beim Adenin beschrieben gefällt wurden, wurden 0,4756 gr. Kupferoxydulverbindung erhalten. Dieselbe enthielt 17,44 % N, 42,23 % Cu und gleichfalls grössere Mengen von Schwefelsäure. Es sind demnach wiedergefunden 0,2015 anstatt 0,2042 gr. Hypoxanthin.

Nach diesen Ergebnissen kann die Ausfällung des Adenins und Hypoxanthins durch Kupfersulfat und Natriumbisulfit wohl als eine vollständige bezeichnet werden, geeignet, nicht nur zur quantitativen Bestimmung dieser Xanthinbasen, sondern auch vor Allem zur Gewinnung derselben.

Es wird weiteren Versuchen vorbehalten bleiben zu entscheiden, wie gross die Ausbeute an Adenin aus Theeextract nach diesem Verfahren im Vergleich mit dem früher von mir beschriebenen Silberverfahren ist, und ob ersteres, abgesehen von dem Preise der anzuwendenden Reagentien, noch andere Vortheile gewährt.

Als gleich vorzügliches Fällungsmittel hat sich das genannte Reagens auch bei Harnsäure nach einigen vorläufigen Versuchen, welche demnächst fortgesetzt werden sollen, erwiesen. Es soll versucht werden, auf dieses Verhalten der Harnsäure eine neue quantitative Bestimmung derselben im Harne zu gründen.

Eine Lösung von freier Harnsäure wird in der Kälte durch Kupfersulfat und Natriumbisulfit allmälig, in der Wärme sofort gefällt.

Ausser den genannten Verbindungen, Adenin, Hypoxanthin und Harnsäure, werden weiter gefällt:

Guanin wird sowohl in der Kälte, wie in der Wärme sofort gefällt.

Methyladenin[1]) verhält sich ebenso.

Theobromin und Caffeïn werden nicht gefällt.

Dimethylhypoxanthin wird in der Wärme nicht gefällt, in der Kälte entsteht nur in conc. Lösungen allmälig ein gelber krystallinischer Niederschlag, aus feinen Nadeln bestehend, der nur als eine Doppelverbindung, nicht als Substitutionsproduct aufgefasst werden kann.

Kreatin und Kreatinin werden nicht gefällt.

Die Löslichkeit der Kupferoxydulverbindungen des Methyladenins, welches nur noch ein durch Alkyle etc. vertretbares Wasserstoffatom enthält, ist, wie vorauszusehen war, erheblich grösser, als die des Adenins selbst. Als 0,145 gr. Methyladenin in derselben Weise, wie bei Adenin angegeben, gefällt wurden, gingen 26,6 mgr. in das Filtrat über.

Kupfersulfat und Natriumhyposulfit.

Von wesentlichem Einfluss auf die Abscheidung der Kupferoxydulverbindungen ist die Art des Reductionsmittels. Natriumhyposulfit wirkt anders wie Natriumbisulfit.

Adenin (freie Base, wie Salz) gibt selbst noch in einer Verdünnung von 1:50,000 eine deutliche Trübung, die nach längerem Stehen sich flockig zu Boden setzt.

Hypoxanthin dagegen wird in der Kälte selbst in 0,5 proc. Lösung nicht gefällt, auch nach längerem Stehen entsteht keine Trübung. Beim Erwärmen scheidet sich hingegen die Kupferoxydulverbindung sofort ab. Kupfersulfat plus Natriumhyposulfit gestattet daher eine Trennung von Adenin und Hypoxanthin.

Methyladenin und Guanin werden wie Adenin auch in der Kälte sofort gefällt. Es wäre interessant, zu erfahren, ob in Bezug auf das genannte Fällungsmittel zwischen Guanin und Xanthin dieselbe Veschiedenheit stattfindet, wie zwischen Adenin und Hypoxanthin. Die Bedeutung des Reagens für den Nachweis der Xanthinbasen würde alsdann gleichwerthig der Pikrinsäure sein, welche bekanntlich mit Guanin und

---

[1]) Methyladenin und Dimethylhypoxanthin werden demnächst in dieser Zeitschrift besprochen werden.

Adenin sehr schwer lösliche, mit Xanthin und Hypoxanthin leicht lösliche oder verhältnissmässig leicht lösliche Verbindungen gibt. Leider stand mir kein Xanthin zur Verfügung, um die Reaction vornehmen zu können.

Eine Lösung von Harnsäure gibt mit Kupfersulfat und Natriumhyposulfft weder in der Kälte, noch in der Wärme einen Niederschlag von harnsaurem Kupferoxydul. Eine Lösung von Harnsäure in Natronlauge mit Fehling'scher Lösung versetzt, trübt sich allmälig in der Kälte und setzt einen weissen Niederschlag, etwas schneller entsteht der Niederschlag auf Zusatz von Natriumhyposulfit, sofort dagegen auf Zusatz von Natriumbisulfit.

Theobromin, Dimethylhypoxanthin, Kreatin und Kreatinin werden nicht gefällt durch Kupfersulfat und Natriumhyposulfit.

Die Kupferoxydulverbindungen der Harnsäure und der Xanthinbasen lösen sich im Ueberschuss von Natriumhyposulfit leicht auf. Dasselbe gilt für die durch Ammoniak und Silbernitat erhaltenen Silberverbindungen der Harnsäure wie der Xanthinbasen; letztere Beobachtung ist schon öfter von Herrn Prof. Kossel gemacht worden.

Ueber die Fällbarkeit der untersuchten Verbindungen durch Kupfersulfat und Natriumdisulfit, resp. Natriumhyposulfit in neutralen oder sauren Lösungen soll die folgende Tabelle eine übersichtliche Zusammenstellung geben:

Verbindungen.	$CuSO_4 + NaHSO_3$.	$CuSO_4 + Na_2S_2O_3$.
Harnsäure	gefällt	—
Adenin	gefällt	gefällt.
Methyladenin	gefällt	gefällt.
Hypoxanthin	gefällt	gefällt, nur in der Wärme.
Guanin	gefällt	gefällt.
Dimethylhypoxanthin .	nur aus starken Lös. in der Kälte, kryst.	—
Theobromin	—	—
Caffeïn	—	—
Kreatin	—	—
Kreatinin	—	—

Um die Resultate der vorliegenden Untersuchung zusammenzufassen. so hat sich ergeben, dass mit Hilfe von Kupfersulfat und Natriumbisulfit alle Xanthinkörper, welche noch eine substituirbare NH-Gruppe enthalten, namentlich aus heissen Lösungen als Kupferoxydulverbindungen gefällt werden. Eine bemerkenswerthe Ausnahme macht allein das Theobromin. In soweit die Fällbarkeit durch das genannte Reagens quantitativ verfolgt wurde, hat es sich als gleichwerthig mit der ammoniakalischen Silberlösung erwiesen. Bei Anwendung von Natriumhyposulfit als Reductionsmittel ist ausserdem eine Unterscheidung und Trennung von Adenin und Hypoxanthin und wahrscheinlich auch von Guanin und Xanthin möglich.

Ueber das Vorkommen von Cellulose in Bacillen, Schimmel- und anderen Pilzen.

Von

Isidor Dreyfuss.

(Der Redaction zugegangen am 27. Juli 1893.)

Seit Payen[1]) besteht Uneinigkeit der Meinungen darüber, ob die Cellulose, der Zellwandbestandtheil der Pflanzen, ein chemisch einheitlicher Körper sei, höchstens durch sogenannte «incrustirende» Substanzen in ihrem physikalischen Verhalten modificirt, oder ob der Begriff der Cellulose mehrere Arten verschiedener Cellulosen umfasse.

Rudolf Reiss[2]) stellte die ganze bezügliche Litteratur zusammen und kam schon auf Grund dieser Sammlung zu dem Ergebniss, dass «die Einheitstheorie für den Grundstoff der Zellmembranen zweifelhaft geworden ist», durch die darauf folgenden eigenen Versuche botanischer und chemischer Natur aber wurde er darauf geführt, in den Zellwänden verschiedener Pflanzensamen eine von der gewöhnlichen Cellulose verschiedene Substanz, «die Reservecellulose» mit Sicherheit anzunehmen. Diese Angabe nun, dass diese sogenannte Cellulose kein einheitlicher Körper sei, wurde seitdem durch mehrere Untersuchungen bestätigt.

E. Schulze stellte die bisher bekannten Versuche der Art in zwei Mittheilungen[3]) zusammen und reihte daran seine eigenen, aus denen als unzweifelhaft hervorgeht, dass neben

---

[1]) Mémoires sur les développements des végétaux. 1844.

[2]) Ueber die Natur der Reservecellulose und über ihre Auflösungsweise bei der Keimung der Samen. Landwirthschaftl. Jahrbücher, Bd. 18, S, 711.

[3]) Zeitschr. f. phys. Chem., Bd. 14, S. 227, und Bd. 16, S. 387.

der Cellulose, welche die bisher aufgestellten Merkmale trägt, noch andere Cellulosen in den Pflanzenzellwänden enthalten sind. E. Schulze geht bei seinen Versuchen von der Angabe Flechsig's[1]) aus, dass die Cellulose ein Anhydrid der Dextrose darstelle und beim Kochen mit verdünnten Mineralsäuren sich in diese überführen lasse. Er betont aber mit Recht[2]), dass sich diese Angabe Flechsig's nur auf einen Versuch mit einem einzigen Objecte, der Baumwollcellulose, stützt und macht nun selbst Versuche mit verschiedenen anderen Pflanzen, aus denen sich als Resultat ergibt, dass, wie bei der Baumwolle, so bei sämmtlichen anderen untersuchten Pflanzen in der Cellulosenlösung nach der Hydrolyse sich Traubenzucker nachweisen lasse, dass aber neben diesem, und zwar manchmal in ganz beträchtlicher Menge, sich noch andere Zuckerarten finden, die also, da sie natürlich andere Anhydride haben wie die Dextrose, von anderen Cellulosen abstammen müssen. Alle Cellulosen aber, die sich so in den Zellwänden der Pflanzen nachweisen lassen, theilt er nach einem ganz anderen Gesichtspunkte, nämlich nach der Löslichkeit in verdünnten Säuren[3]) in zwei grosse Gruppen: einmal in diejenigen, welche das bisher als strenge Forderung aufgestellte Merkmal der Unlöslichkeit in verdünnter Säure tragen, die «ächten Cellulosen», sodann die in verdünnter Salzsäure löslichen und also bei seiner Behandlung im Salzsäureextract befindlichen Zellwandbestandtheile, die beim Kochen ebenfalls in Zucker übergehen, die er «Hemicellulosen» nennt.

So fand er neben dem Traubenzucker, theils «von ächter», theils von «Hemicellulose» abstammend, u. A. Mannose und Pentaglucose, und er schlägt vor, da die betreffenden Cellulosen kaum isolirt gewonnen werden können, einfach immer auf die Zuckerart zu untersuchen, die sie bei der Hydrolyse liefern und sie auch nach diesen zu benennen,

---

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem., Bd. 7, S. 523.
[2]) 2. Mitthlg. (Zeitschr. f. phys. Chem., Bd. 16, S. 389).
[3]) 2. Mitthl., S. 390.

so nämlich, dass man statt der Endung «-ose» die Endung «-an» anhänge, z. B. das Anhydrid der Galactose Galactan nenne, wie es in einzelnen Fällen schon vorher gebräuchlich gewesen. E. Schulze lässt die Frage zunächst noch offen, ob, wenn sich irgendwo nach der Hydrolyse mehrere Zuckerarten zugleich finden, dann dieselben aus einer Mischung oder aus einer chemischen Verbindung verschiedener Cellulosen hervorgegangen sein können.

Es erscheint nun auffallend, dass E. Schulze bei seinen Versuchen, die zumeist im natürlichen System ziemlich hochstehende Pflanzen betreffen, gerade bei den Pflanzen, die von den behandelten am niedrigsten stehen, den Palmaceen, von der gewöhnlichen Cellulose verschiedene Cellulosenkörper nachweisen konnte. Aus diesem Grunde scheint es wichtig, in dieser Richtung den niedrigeren Pflanzen, besonders den Kryptogamen die Aufmerksamkeit zuzuwenden. Ich folgte gerne der dahin gehenden Anregung des Herrn Prof. F. Hoppe-Seyler, jene Untersuchungen auf Umwandlungsfähigkeit der Cellulose in Dextrose und, wo es möglich war, in andere Zuckerarten, des fernern auf ihre Scheidung in «ächte» und in «Hemicellulosen» weiter auszudehnen gerade auf die im System am niedrigst stehenden Körper, auf höhere Pilze, Schimmelpilze und Bacterien. Eingeschlossen in die Versuchsreihe wurde auch ein Versuch mit verkästen tuberculösen Lymphdrüsen, in denen, wie in allem tuberculösen Gewebe und Blut, nach einer Angabe von Ernst Freund[1]) Cellulose enthalten ist.

Was zunächst die höheren Pilze betrifft, so ist man sowohl unter Botanikern wie Chemikern noch sehr im Zweifel über die Natur ihrer Zellmembran. Während C. Richter[2]) eine eigene, von der gewöhnlichen Cellulose verschiedene «Pilzcellulose» leugnet, hält De Bary[3]) an dieser fest und findet ihre Unterscheidungsmerkmale von der Cellulose höherer

---

[1]) Wiener medic. Jahrbücher, 1886, S. 334.

[2]) Sitzungsber. d. Wiener Acad., Bd. 83, S, 494.

[3]) De Bary, Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, S. 8.

Pflanzen in ihrer Unlöslichkeit in Kupferoxydammoniak, sowie in dem Mangel der Jodschwefelsäure-Reaction. Jedoch werden wir weiter unten sehen, dass in beiden Punkten die Pilze sich nach gehöriger Behandlung ähnlich verhalten wie die höheren Pflanzen.

Wir kommen nun zu den Bacterien. Während über die chemische Zusammensetzung der Hefepilze seit lange und fleissig gearbeitet wird, und speciell auch die Cellulose dabei berücksichtigt wurde, während ebenso der Chemismus der Stoffwechselproducte der Spaltpilze schon mehrere Untersuchungen erfahren hat, war über die chemische Zusammensetzung der Spaltpilze selbst bis in die letzten Jahre hinein so gut wie gar nichts bekannt. Brieger[1]) macht gelegentlich seiner Untersuchungen über die Spaltungsproducte der Bacterien allerdings auch schon Angaben über die chemische Zusammensetzung der Bacillen selbst, aber er macht keine Angaben über Cellulose.

Den Grund nun für jene Thatsache, dass die analytische Forschung die Ausscheidungsproducte der Bacterien untersuchte, sich um die Urheber jener Metamorphose aber nicht kümmerte, suchten Nencki und Schaffer[2]), die ersten Untersucher auf diesem Gebiete, mit vollem Rechte nicht in der Schwierigkeit, die nöthigen Mengen von Material zu beschaffen, sondern vielmehr darin, dass die Trennung der isolirt zu behandelnden Culturen von der Nährflüssigkeit so ungemein schwer fällt. Denn bekanntlich sind die Bacillen so klein, dass sie bei unsern gewöhnlichen Filtern anfangs, die Poren passirend, ins Filtrat gehen, nachher aber dieselben verstopfen und ein weiteres Filtriren oder gar Auswaschen illusorisch machen. Nencki und Schaffer überwanden diese Schwierigkeit dadurch, dass sie die Culturen mit verdünnter Mineralsäure fällten. Aber ihre Arbeit verliert hinsichtlich der Cellulose dadurch sehr an Bedeutung, dass sie die Culturen nachher

[1]) Ueber Spaltungsproducte der Bacterien. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 9, S. 7.

[2]) Ueber die chem. Zusammensetzung der Fäulnissbacterien. Journal f. pract. Chemie, Bd. 20 (N. F.), S. 443.

durch Leinwand abfiltrirten und mittelst Fliesspapiers trockneten. Dadurch musste natürlich fremde Cellulose in Menge hineinkommen und zweifelhaft werden, ob die am Schluss gefundene Cellulose von den Bacterien oder von jenen Fremdkörpern herrühre. Ebenso verhält es sich mit den andern Arbeiten aus demselben Laboratorium. So will Bovet[1]) Cellulose in den Bacillen des Erythema nodosum, und Albert Hammerschlag[2]) in Culturen von Tuberkelbacillen, ebenso nachher Nadina Sieber[3]) in Schimmelpilzen nachgewiesen haben. Aber alle diese Arbeiten leiden an dem oben genannten Mangel, der die Herkunft der gefundenen Cellulose zweifelhaft macht. Durchaus ungenügend war auch in all diesen Versuchen der Nachweis der Cellulose selbst, denn nach der der Kupferprobe voraufgegangenen Behandlung konnten wohl noch verschiedene reducirende Körper in der Substanz enthalten sein. Ausserdem hatte Hammerschlag auch Nährlösungen, die sehr reich an Kohlehydraten waren und so Fehlerquellen abgeben konnten.

Vorsichtiger war Livio Vincenzi[4]), der durch Asbest abfiltrirte. Derselbe hatte aber in Bezug auf Cellulose negatives Resultat.

Positiven Befund ergaben dagegen die Versuche von A. Brown[5]) mit Bacterium xylinum. Besonders interessant ist dabei die Beobachtung, dass die Cellulose nicht nur, wenn sie aus Dextrose, sondern auch wenn sie aus Lävulose gebildet war, beim Kochen mit verdünnter Säure in Dextrose übergeht. Denn dadurch wird gezeigt, dass jene Bacterien aus irgend welchen Kohlehydraten, nachdem sie dieselben

---

[1]) Ueber die chemische Zusammensetzung der Bacillen des Erythema nodosum. Monatshefte f. Chem., Bd. 9, S. 1154.

[2]) Bacteriologisch-chemische Untersuchungen der Tuberkelbacillen. Monatshefte f. Chemie, Bd. 10, S. 9—18.

[3]) Beiträge zur chemischen Zusammensetzung der Schimmelpilze. Journal für pr. Chemie, Bd. 23, S. 418.

[4]) Ueber die chemischen Bestandtheile der Spaltpilze. Zeitschrift für phys. Chemie, Bd. 11, S. 181.

[5]) Chem. Soc. 1887, 1, S. 643, sowie 1886, 1, S. 432. Ref. s. Ber. d. deutsch. chem. G., Bd. 20, Referatsb. S. 580.

assimilirt, Cellulose selbständig zu bilden und ihrem Körper anzusetzen vermögen.

Hier anschliessen möchten wir einige Bemerkungen betreffend die Untersuchungen Ernst Freund's[1]) über Cellulose in Tuberkeln und im Blute Tuberkulöser. Denn sonderbarer Weise bezieht E. Freund die Cellulose, die er hier findet, nicht auf Anwesenheit von pflanzlichen Organismen, speciell von Bacterien, was doch so nahe läge, sondern er betrachtet die Cellulose als «eines der chemischen Substrate der bei der Tuberkulose auftretenden Wucherungen» und erinnert, daran anschliessend, wie zur Parallele, an jene Fälle, wo schon früher Cellulose bei thierischen Organismen, wie bei den Ascidien und Tunicaten, nachgewiesen sei. Was nun aber die Art betrifft, wie E. Freund seine Untersuchungen anstellte, so zeigt dieselbe verschiedene Mängel. Erstlich fehlt uns jede Angabe darüber, wie weit bei den Untersuchungen das Hineingelangen von fremder Cellulose vermieden wurde. Dass hierauf wahrscheinlich keine Rücksicht genommen wurde, dürfen wir wohl aus dem Umstande schliessen, dass zu den meisten der Versuche tuberkulöses Lungengewebe, das ja seiner Natur nach viel Cellulose intra vitam aufgenommen haben kann, verwandt wurde und so diesen meisten Versuchen von vornherein der Werth des etwaigen Resultats geraubt wurde. Aber auch bei den übrigen Untersuchungen und von einer etwaigen Unvorsichtigkeit abgesehen, ist der Nachweis der Cellulose keineswegs ein sicherer, und das Gleiche, was oben bereits bezüglich der Versuche mit Bacterien gesagt wurde, gilt auch hier. E. Freund extrahirt nämlich die zerkleinerten und gewaschenen Massen mit Alkohol, Aether und verdünnter Mineralsäure, unterwirft die übrigbleibenden «Kügelchen» der Hydrolyse und dann der Trommer'schen Probe. Das Kupfer wird reducirt, und nun hält er die ganzen nach der Säurebehandlung ungelöst bleibenden «Kügelchen» für Cellulose. Dass bei dieser wenig durch- und angreifenden Behandlung verschiedene reducirende Körper zurückbleiben konnten, die

---

[1]) A. a. O.

keineswegs besonders resistent zu sein brauchten und desshalb von der Cellulose sehr verschieden sein konnten, und dass daher auf diese Art ein einwandsfreier Nachweis der Cellulose nicht gelingen kann, liegt auf der Hand. Wir werden weiter unten zeigen, wie wir die Cellulose isolirten, sodass nachher nach der Hydrolyse jeder andere reducirende Körper ausser von der Cellulose stammender Dextrose ausgeschlossen war, und so natürlich obigen Uebelstand vermieden.

Wir sehen also, wenn wir die Ergebnisse der Litteratur zusammenfassen, hinsichtlich der Bacterien keine unanfechtbaren Versuche über Cellulose, höchstens diejenigen von A. Brown, und was die höheren Pilze betrifft, Uneinigkeit, ob sie «gewöhnliche» oder «Pilzcellulose» enthalten. Diese Fragen behandeln die in Folgendem beschriebenen Versuche.

Der Weg, den ich im Allgemeinen einschlug, war in Kürze folgender: Die Objecte wurden — in den nöthigen Fällen nach vorhergehender Zerkleinerung — mit Wasser gewaschen, mit Alkohol, Aether, verdünnter Salzsäure (ungefähr 2%), verdünnter Natronlauge (ebenfalls etwa 2%) extrahirt, und zwar mit sämmtlichen Extractionsmitteln längere Zeit (einige Tage) stehen gelassen und dann erwärmt. Der nach der Extraction mit diesen vier Medien bleibende Rest wurde sodann im Oelbad mit concentrirtem Aetzkali auf 180° erhitzt. Denn bei dieser Behandlung bleibt, wie F. Hoppe-Seyler[1]) gezeigt hat, die Cellulose vollständig unverändert, während alle anderen organischen Substanzen sich zersetzen, eine Angabe, auf die G. Lange[2]) sogar eine quantitative Bestimmung der Cellulose gegründet hat. An diesem Verhalten der Cellulose gegen Aetzkali hat man eine scharfe Grenze für die Cellulose. Bis jetzt nun ist dies Verhalten nur für die eigentliche, die bisher aufgestellten Merkmale tragende Cellulose, die also bei der Hydrolyse Dextrose liefert, bekannt. Es könnte aber sehr wohl sein, dass bei den Pflanzen noch andere Cellulosen vorkommen, die andere

---

[1]) Ueber die Bildung von Huminsubstanzen, Zeitschrift für phys. Chem., Bd. XIII, S. 84.

[2]) Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. XIV, S. 283.

Zuckerarten liefern, und die gleichwohl jenes Verhalten zum Aetzkali zeigen. Jedenfalls ist dieses Verhalten, diese eminente Resistenz, für Cellulose sehr charakteristisch, und man hat darin ein vorzügliches Unterscheidungsmerkmal derselben gegen eine grosse Zahl von Kohlehydraten und andere Körper, die in den Pflanzen mit der Cellulose vereinigt vorkommen. Gestützt auf diese Eigenschaft ist man im Stande, auch in kleinen Quantitäten das Vorkommen der Cellulose festzustellen, und was besonders wichtig und angenehm erscheinen mag, es bleibt bei dieser Behandlung sogar die Textur des Gewebes vollständig erhalten, wovon man sich durch das Mikroskop leicht überzeugen kann. Man erhitzt nur mit sehr wenig[1]) Wasser und viel Aetzkali langsam und die Textur bleibt dann geschont. Die Anordnung bei der Kalischmelze war im Wesentlichen die gleiche, wie sie F. Hoppe-Seyler[2]) angegeben, und ihre Schilderung mag desshalb hier unterbleiben.

Bleibt nun nach diesem Processe ein ungelöster Rest, der nach Auflösung in concentrirter Schwefelsäure und Kochen der verdünnten Lösung den Nachweis von Traubenzucker gestattet, so darf es nach den oben citirten Versuchen F. Hoppe-Seyler's als sicher hingestellt werden, dass jener ungelöste Rest aus Cellulose bestand[3]) und es mag jetzt erkannt werden, wie unsicher, von allem Anderen abgesehen, die früheren Untersuchungen waren, die nach einfacher Extraction mit Alkohol, Aether und höchstens noch mit ganz verdünnter Natronlauge in dem Reste nach Cellulose suchten, in einem Reste also, der ganz gut andere Kohlehydrate von ähnlicher Zusammensetzung enthalten konnte, sowie andere Körper[4]), die nach dem Kochen mit Säure Kupferoxyd reduciren, ohne Traubenzucker zu sein.

---

[1]) Die Substanzen sind, mit etwas Wasser befeuchtet, mit dem 10fachen Gewichte Aetzkali zu erhitzen. Verdünntes Kali kann zersetzend wirken (F. Hoppe-Seyler).

[2]) A. a. O, S. 77.

[3]) Auch Hemicellulosen können der Einwirkung des Aetzkali bei hoher Temperatur Widerstand leisten.

[4]) F. Hoppe-Seyler, Handbuch, 4. Aufl. — Landwehr, Ueber Mucin, Metalbumin und Paralbumin. Zeitschr. f. phys. Chem., Bd. 8, S. 114.

Es wurde also nach dem Erkalten die Masse — das wenige Wasser war durch den Kühler abgelaufen — aus der Retorte herausgewaschen, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, und, da sich dabei in der Regel sehr viel Kohlensäure entwickelte, einige Zeit zum Absetzen des Ungelösten im Vacuum stehen gelassen. Sodann wurde das Ganze durch Asbest filtrirt, das auf dem Filter gebliebene gut gewaschen und das ganze Filter im Luftbade bei 105° getrocknet, die getrocknete Masse bis zur Durchtränkung des Asbestes mit concentrirter Schwefelsäure übertropft und kurze Zeit über Schwefelsäure stehen gelassen. Die Masse ward nachher mit etwa der zwanzigfachen Menge Wasser übergossen, so dass sie ungefähr 5 % Säure enthielt und über freier Flamme 1—2 Stunden erhitzt, noch heiss neutralisirt (in der Regel mit Baryumcarbonat), filtrirt und eingedampft. Bei dem so entstandenen Syrup wurde sodann die Untersuchung auf Traubenzucker vorgenommen, und zwar bediente ich mich dabei in sämmtlichen Fällen sowohl der Trommer'schen Probe, als auch hauptsächlich der Phenylhydrazinprobe, in manchen Fällen auch der Gährungsprobe, indem dabei der Alkohol mittelst der Jodoformprobe, die Kohlensäure mit Barytwasser nachgewiesen wurde.

Natürlich wurde, wo es die Menge erlaubte, auch auf die Löslichkeit in Kupferoxydammoniak geprüft. Jedoch erscheint diese Absicht von vornherein ziemlich aussichtslos bei den Bacterien, wo man nach der Behandlung mit Natronlauge überhaupt makroskopisch nichts mehr erkennen kann — was schon Nencki und Schaffer berichten und auf die Lösung ihres Mycoproteïns zurückführen —, vielmehr auf die Weiterbehandlung des als Filter benützten Asbestes angewiesen ist.

Selbstverständlich musste bei der ganzen Procedur sorgsam darauf gesehen werden, dass keine Cellulose von aussen in die zu behandelnden Massen hineingelangte, dass also vor Allem sämmtliche Gegenstände, die irgendwie in Betracht kamen, beständig vor Staub geschützt waren und nie mit Papier und dergl. in Berührung kamen. Desshalb wurde nie durch Papier filtrirt, sondern immer Asbest benützt und zwar

vorher geglühter Asbest. Ebenso wurden bei Herstellung der Culturen nur Asbest, nie Baumwollpfropfen als Verschluss verwandt. Kurzum, bei dem ganzen Processe ging ich so zu Werke, dass ich mich vor der Verunreinigung durch fremde Cellulose vollständig geschützt wusste.

Im Einzelnen nun stellten sich die Resultate, die ich in der Reihenfolge gebe, in der die Versuche angestellt wurden, folgendermassen:

I. Eine Polyporus-Art.

Der zuerst zur Untersuchung gekommene Pilz, eine von einem abgestorbenen Pappelstamme abgenommene Polyporus-Art, ein besonders harter und zäher Pilz, wurde zuerst völlig von den äusseren, mit Holz in Berührung gekommenen Schichten befreit und dann behandelt, wie oben geschildert.

Von der auf diese Weise erhaltenen Lösung wurde ein Theil zur Untersuchung auf Traubenzucker verwandt. Dieselbe reducirte alkalische Kupferlösung sehr stark und ergab bei der Phenylhydrazinprobe einen Niederschlag, der unter dem Mikroskop die bekannten Glucosazonkrystalle zeigte. Es muss angenommen werden, dass der grösste Theil aus Traubenzucker bestand.

Mit dem Reste der vergohrenen Flüssigkeit wurde die Probe mit Phloroglucin und Salzsäure auf Pentaglucose angestellt, deren Vorhandensein auch nach der Gährung recht wohl angenommen werden konnte, da ja die Xylose durch Hefe unvergährbar ist. In der That wurde auch durch Erhitzen mit Phloroglucin und Salzsäure eine schöne rothe Flüssigkeit erzielt, die bei längerem Stehen immer dunkler und kirschenfarbiger wurde. Des Vergleichs halber wurde nun dieselbe Probe mit unvergohrener Flüssigkeit gemacht, und auffallender Weise fiel sie hier, wenn auch ebenfalls deutlich, doch viel schwächer aus. Ein Versuch, den ich deshalb mit Bierhefe allein anstellte, hatte ein negatives Resultat. Vielleicht lässt sich jener Umstand, dass nämlich Pentaglucosenreaction bei vergohrener Flüssigkeit deutlicher ist als bei

unvergohrener, der Angabe von E. Schulze[1]) an die Seite stellen, der auch bei seinen Syrupen nach Auskrystallisirung und Entfernung des Traubenzuckers — ein Vorgang, welchem hier die Entfernung durch Gährung entspräche — eine viel deutlichere Pentaglucosenreaction bekam, woraus er schliesst, dass vielleicht die Gegenwart von Traubenzucker jener Reaction schadet.

Ein Theil des bei der Kalischmelze Ungelösten war aufbewahrt worden. Dasselbe war in Kupferoxydammoniak fast vollständig löslich und liess sich als weisser Körper durch verdünnte Säuren wieder ausfällen. Es liessen sich die Partikelchen unter dem Mikroskope durch Jod und concentrirte Schwefelsäure nur blass-violett färben, das bei der Kalischmelze Ungelöste trug also nicht alle Merkmale der Cellulose. Jedenfalls ist diese Violett-, nicht Blaufärbung die einzige auffallende, aber scheinbar geringe Verschiedenheit.

Was nun die Umwandlung dieser Cellulose in verschiedene Zuckerarten betrifft, so haben wir gesehen, dass in unserer Endflüssigkeit, die nach der beschriebenen Behandlung natürlich nur «ächte Cellulose» enthalten konnte, nach der Hydrolyse hauptsächlich Dextrose, wie in allen bisher untersuchten Pflanzen, nachzuweisen war, daneben aber eine gewisse Menge von Pentakohlehydraten. Die «ächte Cellulose» des behandelten Pilzes besteht also aus Anhydriden dieser verschiedenen Zuckerarten.

II. Agaricus campestris (Champignon).

Die Behandlung war im Wesentlichen dieselbe wie im vorigen Falle und wurde nach mehrfacher Kalischmelze ein grau-weisses Pulver erhalten, das sich, wenn auch schwer, in Kupferoxydammoniak auflöste und durch verdünnte Säuren daraus als weisser Niederschlag wieder erhalten werden konnte, entgegen der Angabe Fremy's[2]), nach der die Cellulose des Champignon in Kupferoxydammoniak vollständig unlöslich sein soll.

---

[1]) 2. Mittheilg., S. 417.
[2]) Jahresbericht 59.

Nachdem das bei der Kalischmelze erhaltene Pulver in derselben Weise wie im vorigen Falle weiter behandelt war, erhielt man eine Masse, welche alkalische Kupferlösung sehr stark reducirte und bei Einwirkung von Bierhefe reichliche Gährung zeigte. Die Phenylhydrazinprobe ergab einen Niederschlag, der unter dem Mikroskop Krystalle von der typischen Form und Lagerung der Glucosazonkrystalle darbot, die sich aber durch ungewöhnlich kleine Dimensionen auszeichneten, so dass sogar starke Vergrösserung zu Hilfe genommen werden musste. An der Identität derselben konnte aber umsoweniger gezweifelt werden, als sie beim mehrfachen Umkrystallisiren aus Alkohol immer gleich blieben, als ferner, wie erwähnt, die Hefegährung eine sehr starke war, und als drittens ja durch den vorigen Versuch bewiesen ist, dass Cellulose in der Form von Dextrosenanhydrid bei den höheren Pilzen vorkommt. Wir werden weiterhin in allen Fällen au diese Formen stossen. Aber Form und Lagerung der Krystalle war die gewöhnliche — nur ihre Grösse differirte von der gewöhnlich gesehenen —, und Gährung und Reduction waren sehr reichlich, was nach der Kalischmelze nach den bisherigen Erfahrungen nicht leicht einem andern Körper als der Cellulose und daraus gewonnenem Traubenzucker zugeschrieben werden kann.

Die Prüfung mit Phloroglucinsalzsäure auf Pentaglucosen ergab nur einen leicht röthlichen Schimmer, auch wenn die Probe mit vergohrener Flüssigkeit vorgenommen wurde, so dass also jene Körper nicht in allen Pilzarten zu sein scheinen. Die «ächte Cellulose» des Champignons besteht also wohl hauptsächlich aus Anhydrid der Dextrose.

Mit diesen zwei Versuchen war gezeigt, dass die Pilze überhaupt «ächte Cellulose» enthalten, und es konnte somit nun zu der Aufgabe übergegangen werden, dieselbe auch bei den niedrigsten Pilzen, den Bacterien, zu suchen. Naturgemäss konnten hier in allen Fällen, bei der Feinheit der Objecte, selbst bei verhältnissmässig grosser Menge von verwandtem Material, nur Spuren erwartet werden.

Zunächst kamen tuberkulöse verkäste Lymphdrüsen zur Untersuchung.

III. Verkäste Lymphdrüsen.

Eine grössere Menge stark verkäster tuberkulöser Lymphdrüsen — Lunge wurde aus oben entwickelten Gründen nicht gewählt — wurde in der Reibschale zerkleinert und wie die vorigen Objecte behandelt. Nach der Behandlung mit Natronlauge war in der mittlerweile beim öfteren Filtriren hinzugekommenen Asbestmasse makroskopisch nichts mehr zu sehen, und auch mikroskopisch gelang es nicht, die von Freund angeblich erreichte blaue Färbung mit Jod — Chlorzink zu erzielen. Der Umstand, dass nach der Behandlung mit verdünnter Natronlauge makroskopisch fast nichts mehr zu sehen war, ist ein Beweis dafür, dass die Meinung Freund's, die ganzen nach Behandlung mit verdünnter Säure ungelösten «Kügelchen» beständen aus Cellulose, auf Irrthum beruhen muss. Nach der Extraction mit Natronlauge wurde die ganze Asbestmasse in der üblichen Weise mit concentrirtem Alkali auf 180° erhitzt und dann wie in den vorigen Fällen weiter behandelt behufs Umwandlung von etwa vorhandener Cellulose in Dextrose. Die dann folgende Untersuchung auf Letztere ergab deutliche Reduction von alkalischer Kupferlösung. Die Phenylhydrazinprobe lieferte einen ziemlich reichlichen Niederschlag und dieser bot überraschender Weise unter dem Mikroskop dasselbe Bild, das er bei der Untersuchung von Agaricus campestris gezeigt hatte, nämlich jene ausserordentlich kleinen Kryställchen, die aber vermöge ihrer Lagerung und Form nicht anders denn als Glucosazonkrystalle gedeutet werden können.

Ein Theil des Asbestes wurde mit Kupferoxydammoniak übergossen. Eine Auflösung war natürlich nicht sichtbar, doch wurde aus dem abfiltrirten Kupferoxydammoniak durch verdünnte Salzsäure ein im Ueberschuss der Säure unlöslicher Niederschlag, also Cellulose, gewonnen, wie ja auch nach Nägeli[1]) die Cellulose der Essigmutter in Kupferoxydammoniak löslich ist.

Wie aus Obigem hervorgeht, konnte ich die Angabe Freund's, dass in tuberkulösen Geweben ein Körper vor-

---

[1]) Journal f. prakt. Chemie, Bd. 17, S. 422.

handen sei, der, in gewöhnlichen Lösungsmitteln unlöslich, sich in concentrirter Mineralsäure löse, beim Kochen der verdünnten Lösung in Dextrose übergehe, der sich weiterhin in Kupferoxydammoniak löst und daraus als weisser Niederschlag wieder erhalten werden kann, bestätigen und konnte diesen Körper, nachdem er sich einerseits beim Erhitzen mit concentrirtem Aetzkali nicht gelöst hatte, und nachdem andererseits seine Umwandlung in Traubenzucker durch die Phenylhydrazinprobe viel sicherer nachgewiesen war als durch die Trommer'sche Probe allein, um so gewisser für Cellulose erklären, nur ist diese sicherlich nicht in so grosser Menge und in Form von Kügelchen vorhanden, wie es Freund angibt.

Die Phloroglucinsalzsäureprobe (auf Pentaglucosen) ergab nur einen schwach röthlichen Schimmer. Die Untersuchung auf Mannose (Niederschlag durch essigsaures Phenylhydrazin in der Kälte) ergab negatives Resultat.

Es konnte also im Wesentlichen nur die Cellulose constatirt werden, welche bei der Hydrolyse Dextrose liefert. Ob diese nun, wie Freund will, als «chemisches Substrat» der tuberkulösen Gewebe aufzufassen sei oder ob sie auf darin enthaltene Bacterien zurückgeführt werden müsse, das lehren uns die nachstehenden Versuche mit Reinculturen, die in der That dasselbe Resultat lieferten, wie die tuberkulösen Lymphdrüsen, also den Schluss rechtfertigen, dass die in den tuberkulösen Geweben vorkommende Cellulose auf die darin enthaltenen Bacterien zurückzuführen sei).

IV. Bacillus subtilis.

Zur Erhaltung der Reincultur verfuhr ich nach Roberts und Hans Buchner[1]), indem ich ein Heuinfus 1 Stunde erhitzte und dann bei 36° stehen liess, bis es sich mit einer Schicht von Heubacillen bedeckt hatte. Nun war natürlich nicht daran zu denken, in dieser sehr viel Heutheilchen ent-

[1]) Untersuchungen über niedere Pilze. S. 140, Anm.

haltenden Flüssigkeit die Cellulose als Bestandtheil der Bacillen nachzuweisen, der Bacillus musste zuerst auf eine von fremder Cellulose sowie auch von sonstigen Kohlehydraten freie Nährlösung übergeimpft werden. Dazu wurde die alte Pasteur'sche Lösung benützt, die auf einen Liter Wasser 10 gr. Pepton und etwas Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat enthält. Mit dieser Flüssigkeit wurden mehrere grössere, 2—3 L. haltende Kolben, sowie ein kleines Kölbchen zur Hälfte angefüllt. Von der dargestellten Cultur wurden nun auf das kleine Kölbchen und erst von diesem aus nach einem Tage auf den Inhalt der grösseren Kolben, der chemisch verwendet werden sollte, übergeimpft. Auf diese Weise erhielt ich Culturen, die von Heu und sonstigen Verunreinigungen sicher frei waren. Die Kolben wurden mit Asbest verschlossen.

Bezüglich des Verhaltens der Culturen auf diesem Nährboden sah ich das Nämliche, was G. Vandevelde[1]) in seinen «Studien zur Chemie des B. subtilis» von seinen auf Fleischextractlösung gezüchteten Culturen schildert. Am ersten Tage trübt sich die Flüssigkeit, wird am dritten Tage wieder klarer, aber nicht mehr ganz klar, und zeigt nachher auf der Oberfläche eine derbe, graue, zusammenhängende Haut, die nach einiger Zeit aufspringt und zu Boden sinkt, um eine neue, zartere Decke folgen zu lassen. Nach drei Wochen war die ganze Flüssigkeit von sich bewegenden Bacillen durchsetzt, wie ich mich des Oeftern mittelst hängender Tropfenpräparate überzeugte.

Auf diese Weise erhielt ich reichliche Mengen von Culturen. Nun trat aber eine Hauptschwierigkeit heran, die schon, wie erwähnt, von Nencki und Schaffer gebührend gewürdigt wurde, nämlich die Culturen von der Nährflüssigkeit zu trennen. Ich filtrirte einfach durch geglühten Asbest ab, soviel Geduld und Zeit dies Verfahren auch fordert. Die abfiltrirten Culturen wurden mit Wasser gewaschen, mit Alkohol, Aether u. s. w. extrahirt, mit concentrirtem Alkali auf 180° erhitzt und, wie bereits geschildert, weiter behandelt

---

[1]) Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. XIII, S. 367.

behufs Umwandlung von etwa vorhandener Cellulose in Zucker. Die am Ende resultirende Flüssigkeit ergab in 2 Mal angestellten Versuchen schwache, aber deutliche Reduction von alkalischer Kupferlösung. Die Phenylhydrazinprobe ergab wieder jene charakteristischen kleinen Glucosazonkrystalle, die wir jetzt schon in mehreren Fällen getroffen. Wir können also annehmen, dass die Heubacillen in ihrer Zellmembran «ächte Cellulose», wenn auch nur in Spuren, enthalten. Und da nach der vorausgehenden Behandlung wohl der Reduction von Kupferoxyd mehr Bedeutung wie sonst zugesprochen werden muss, so darf man wohl den aus der Cellulose dargestellten Zucker für Traubenzucker, diese Cellulose also für ein Anhydrid der Dextrose, erklären. Für Gährungsversuche reichte leider das Material nicht aus.

V. Eiterbacillen.

Ein von Herrn Privatdocent Dr. Martin B. Schmidt aus pyelonephritischem Urin dargestellter Eiterbacillus wurde mir von demselben gütigst zur Verfügung gestellt, wofür ich an dieser Stelle meinen besten Dank ausspreche. Es ist ein kleiner Pilz, der sich zu Zweien aneinander lagert und so das Aussehen eines Diplococcus gewinnen kann, aber die Fähigkeit hat, zu Stäbchen auszuwachsen, der wegen seiner Feinheit allerdings nur schwache Ausbeute an Cellulose versprach. Ich verwandte denselben aber trotzdem zu meinen Zwecken wegen seiner ungemein raschen Vermehrung. Es wurde von dem Pilze einerseits auf kleine Erlenmeyer'sche Kölbchen mit Gelatine-Bouillon übergeimpft, und zwar in Stichen, andrerseits auf einen grossen, mehrere Liter haltenden Kolben mit Urin. Auf der Gelatine zeigten sich bei gewöhnlicher Temperatur — es war im Sommer — schon am nächsten Tage an den Einstichstellen starke, schön weisse, 1—2 mm. im Durchmesser haltende Culturen, die schon nach drei bis vier Tagen zu einer dicken, die ganze Oberfläche bedeckenden Schicht zusammengewachsen waren. Die Menge der Bacillen wurde noch dadurch erhöht, dass jedesmal, wenn die Oberfläche

bedeckt war, die Gelatine bei 25° verflüssigt, durcheinandergeschüttelt, und so die Oberfläche für neue Generationen frei gemacht wurde. Im Urin zeigte sich wenige Tage nach dem Einbringen der Keime die Oberfläche von einer grauen Schichte bedeckt und später die ganze Flüssigkeit von Bacillen durchsetzt. Jedoch war die Vermehrung hier eine weniger starke als auf der Gelatine-Bouillon.

Beide Arten von Culturen, Gelatine sowohl wie Urin, blieben mehrere Wochen stehen und wurden dann jede für sich untersucht. Unter dem Mikroskop boten beide das gleiche Aussehen. Die Gelatine-Culturen wurden im Heisswassertrichter abfiltrirt und gewaschen. Im Uebrigen war die Behandlung die nämliche wie im vorigen Falle. Ebenso stimmte das Resultat genau mit dem vorigen überein: Die am Schlusse des Versuches erhaltene Flüssigkeit reducirte deutlich alkalische Kupferlösung, und die Phenylhydrazinprobe ergab wiederum jene Kryställchen, die uns in dieser Dimension jetzt schon Bekannte geworden sind. Das vorhin Gesagte auch hier angewandt, enthält also auch dieser Bacillus «ächte Cellulose» im Sinne E. Schulze's, und zwar wiederum solche, die bei der Hydrolyse Dextrose liefert, also deren Anhydrid darstellt. Zu Gährungsversuchen, sowie zur Untersuchung auf andere Zuckerarten fehlte leider auch hier das Material.

VI. Aspergillus glaucus.

Während der beschriebenen Versuche waren auf den aufbewahrten alkalischen Lösungen, die von den Extractionen der verschiedenen Objecte mit Natronlauge herrührten, dichte Schimmelrasen und zwar solche von Aspergillus glaucus entstanden. Da dieselben durch beständiges Zudecken vor Eindringen von Staub geschützt waren, konnten sie recht wohl zur Untersuchung auf Cellulose verwandt werden. Ich verfuhr mit den Schimmelpilzen ebenso wie mit den vorhergehenden Versuchsobjecten und erhielt am Ende eine Flüssigkeit, die Kupferoxyd deutlich reducirte und bei der Phenylhydrazinprobe eben jene mit Ausnahme des ersten in allen

vorhergehenden Fällen gefundenen Krystallfiguren lieferte, diesmal etwas grösser, aber immer noch starke Linsen verlangend. Auch diese Schimmelpilze enthalten also «ächte Cellulose» und wahrscheinlich wieder solche, die Dextrose liefert.

Damit schliesse ich den ersten Theil meiner Mittheilungen. Dieselben ergeben, dass sämmtliche zur Untersuchung gekommenen Pilzarten, sowohl die höheren, grosse Mycelverbände bildenden, als auch besonders jene kleinsten Lebewesen, die Bacterien, Cellulose enthalten, und zwar im Sinne E. Schulze's «ächte Cellulose», d. h. solche, die sich in verdünnter Mineralsäure nicht löst.

Was das Verhalten dieser Cellulose bei der Hydrolyse betrifft, so haben wir gesehen, dass sie, allen anderen bisher untersuchten Pflanzen entsprechend, in sämmtlichen Fällen sich in Dextrose überführen liess, bei dem einen der untersuchten höheren Pilze jedoch auch Pentaglucosen lieferte. Bei den Bacterien und Schimmelpilzen auf diese lelzteren Zuckerarten zu untersuchen, fehlte es leider an Material. Auffallend war, dass die Glucosazonkrystalle, ausgenommen bei der Untersuchung des ersten Pilzes, in allen Fällen übereinstimmend ungemein klein waren, auch beim Champignon, wo doch die reichliche Gährung, abgesehen von der in allen Fällen gefundenen Reduction, die Identität der Dextrose bewies.

Nachdem auch bei den tuberkulösen Lymphdrüsen dieselben kleinen Kryställchen sich zeigten, unterliegt es wohl keinem Zweifel mehr, dass die bei tuberculösem Gewebe gefundene Cellulose auf darin befindliche Bacterien zu beziehen, nicht aber, wie E. Freund will, als «chemisches Substrat» jener Gewebe zu betrachten ist.

Was E. Schulze's «Hemicellulosen» betrifft, so habe ich aus fast allen erhaltenen Salzsäureextracten nach längerem Kochen Osazonkrystalle erhalten können, und dürfen diese vielleicht auf Hemicellulosen bezogen werden. Doch muss ich zugeben, dass bei den vielen Körpern, welche in

jenen Extracten enthalten sein können, jene Deutung eine ganz unsichere ist.

Betrachten wir das Gesammtresultat, so kann bei den zuerst untersuchten Pilzen, besonders bei Polyporus als sicher constatirt werden, dass sie wirkliche Cellulose enthalten, die durch Unlöslichkeit beim Schmelzen mit Aetzkali charakterisirt ist und zwar solche, die bei der Hydrolyse im Wesentlichen Traubenzucker liefert. In den anderen haben sich allerdings auch Spuren gefunden von Körpern, die beim Schmelzen mit Aetzkali einen Rückstand liefern, welcher die Charaktere der eigentlichen Cellulose zeigt, aber in so geringer Quantität, dass eine weitere Untersuchung durchaus nothwendig erscheint, da von dem Glucosazon die näheren Charaktere nicht weiter untersucht werden konnten ausser der Krystallform, und auch die Reductionsprobe nur sehr schwach ausfiel. Ueberhaupt sollen bei der Schwierigkeit dieser Untersuchungen, die beschriebenen Versuche nur als Vorversuche gelten, aber jedenfalls ist ihre Angängigkeit bei dem Mittel, das wir in dem charakteristischen Verhalten der Cellulose gegen Aetzkali besitzen, diese auch in kleinsten Mengen sicher zu bestimmen, unzweifelhaft.

Ist es nun auch zunächst noch nicht gelungen, für verschiedene Bacterien verschiedene Cellulosen als für die einzelnen Arten charakteristische Bestandtheile nachzuweisen, so muss, bei der von E. Schulze klar gezeigten Thatsache, dass verschiedene Pflanzen verschiedene Cellulosen enthalten können, und bei dem obigen Befunde der beiden höheren Pilze, der jene Thatsachen auch für die Klasse der Fungi beweist, dennoch die Möglichkeit einer chemischen Unterscheidung mancher Bacterien zugegeben werden. Insbesondere ist es nicht ausgeschlossen, dass auf diese Weise der Streit über die Identität oder Nichtidentität mancher Bacterienarten einst einem Ausgleiche näher gebracht werden kann.

Neben den bisher berichteten chemischen Versuchen gingen solche anderer Art einher, welche die Färbung der Bacillen betrafen. Es schien nämlich interessant, nach der Extrahirung mit den verschiedenen Medien jedesmal die Färbe-

kraft der Bacillen auf Zu- oder Abnahme zu prüfen und dadurch zu erfahren, ob, eventuell durch welches Extrahens der die Farbe bindende Körper entzogen werde. Auch A. Hammerschlag[1]) hatte schon darauf geachtet. Er prüfte seine Tuberkelbacillen, nachdem er sie mit Alkohol, Aether und Natronlauge von 0,5 % extrahirt hatte, auf ihre Färbbarkeit und fand, dass sie nach dieser Behandlung ihre Form, wenn auch in manchmal etwas zerrissenem Zustande, im Wesentlichen bewahrt haben, mit Anilinfarbstoffen jedoch sich nicht mehr färben lassen. Er schliesst daraus, dass das durch die Natronlauge entzogene Eiweiss den Farbstoff binde.

A priori konnte angenommen werden, dass die Cellulose der die Farbe bindende Körper nicht sei, mit anderen Worten, dass die Cellulose bei dieser «mikrochemischen Reaction»[2]) nicht Theil nehme; denn erstens färben sich ja mit denselben Farben auch die Kerne thierischer Zellen und zweitens sehen wir in der Industrie, wie, um Cellulose zu färben, sogar kräftige Beizen angewendet werden müssen. Dass aber die Bacterien eine solche Beize nicht in sich schliessen, werden wir nachher daraus ersehen, dass sie auch nach Behandlung mit verdünnten Säuren sich färben lassen. Es war also wegen dieses Verhaltens der Cellulose vorauszusehen, dass die Färbekraft nach Behandlung mit Natronlauge, sicherlich aber nach der Kalischmelze verschwinden werde.

Als besonders geeignet bei diesen Untersuchungen erwies sich ein von Franz Hoffmeister angegebener und von Universitätsmechaniker Albrecht in Tübingen verfertigter Apparat, der es gestattet, sechs Deckglaspräparate zu gleicher Zeit zu färben, sie alle gleich lange in der Farbe zu lassen und dadurch die nachherige Vergleichsfähigkeit ihrer Färbekraft wesentlich zu erhöhen.

So wurden denn in obiger Hinsicht alle Objecte untersucht (mit Ausnahme der Lymphdrüsen), die auch chemisch

---

[1]) A. a. O., Tafel I, Fig. 2.
[2]) Carl Fränkel, Grundriss der Bacterienkunde, S. 61.

behandelt waren. Ausserdem Tuberkelbacillen, und zwar sowohl aus der Wand von Cavernen einer tuberkulösen Lunge, die ich der Güte des Herrn Professor Dr. von Recklinghausen verdanke, als auch aus Reinculturen, die mir Herr Privatdocent Dr. E. Levi liebenswürdiger Weise überliess, wofür ich diesen Herren an dieser Stelle herzlich danke.

Alle Objecte zeigten nun bei der Färbung übereinstimmende Resultate. Nach Behandlung mit Alkohol zeigt die Färbekraft keine Veränderung, ebenso nach der mit Aether und mit Salzsäure. Nach der Behandlung mit Natronlauge dagegen färbten sich die Bacterien und Schimmelpilze sowohl wie die Fasern der grossen Pilze nur an ganz vereinzelten Stellen, offenbar an solchen, wo die Natronlauge nicht genügend eingewirkt hatte. Das Cellulosepulver dagegen, das von den höheren Pilzen durch die Kalischmelze erhalten war, verhielt sich den Anilinfarbstoffen gegenüber vollständig negativ.

Wir sehen also aus Obigem, dass der die Farbe bindende Bestandtheil ein in verdünnter Natronlauge löslicher, in Alkohol, Aether und verdünnter Mineralsäure unlöslicher Körper sein muss. Daraus geht auch hervor, dass die Annahme A. Hammerschlag's, die Eiweisskörper würden den Farbstoff binden, nicht das Richtige treffen kann, denn diese gehen ja als Acidalbumine mit Säure in Lösung, und müsste in diesem Falle die Färbungsfähigkeit bei der Behandlung mit Säure schwinden. Was nun aber einen Körper betrifft, der den oben aufgestellten Forderungen entspricht, so können hier wohl nur die Nucleïne in Betracht kommen. Dieselben sind in Alkohol, Aether und verdünnter Mineralsäure unlöslich, in verdünnter Natronlauge dagegen löslich, sie sind in thierischen und pflanzlichen Zellen gleich verbreitet, und sie sind es desshalb, die wahrscheinlich jene Verbindungen mit den Anilinfarbstoffen eingehen.

Bemerkt mag werden, wenn auch ohne vorläufig einen Schluss daraus zu ziehen, dass Natronlauge, in der aus Eiter gewonnenes Nucleïn gelöst war, auf Anilinfarbstoffe viel weniger zerstörend einwirkte als reine Natronlauge. Jedenfalls steht die Annahme, dass die Nucleïne die Farbstoff bindenden Körper seien, mit der Kernlosigkeit der Bacterien nicht im Wider-

spruch; denn auch die Hefepilze scheinen ja kernlos und enthalten trotzdem beträchtliche Mengen von Nucleïnen, die also durch den ganzen Zellleib verbreitet sein müssen, wozu auch die diffuse, ja in der Peripherie sogar oft noch stärkere Färbung der Pilze stimmen würde.

Zum Schluss ist es mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Hoppe-Seyler, für die Anregung zu dieser Arbeit und das lebhafte Interesse, das er derselben fortwährend entgegenbrachte, herzlichen Dank zu sagen.

Ueber das Vorkommen von Gallensäuren, Hippursäure und Benzoësäure in den Nebennieren.

Nach Untersuchungen des Herrn Dr. Karl Beier mitgetheilt

von

E. Stadelmann.

(Der Redaction zugegangen am 29. Juli 1893.)

Erst sehr allmälig beginnt sich das Dunkel zu lichten, in welches unsere Kenntnisse über die Function der Nebennieren, dieser so unscheinbaren kleinen Organe, bis jetzt noch eingehüllt sind. Auch noch heute zu Tage werden jedem Mediciner die Experimente von Brown-Sequard[1]) von Interesse sein mit Rücksicht darauf, dass er nach Exstirpation derselben bei Thieren schnellen Tod und eine Anhäufung von Pigment auffand, weil dieses Versuchsresultat eine Analogie in unseren Erfahrungen über Morbus Addisonii und der dabei so häufigen Erkrankung der Nebennieren hat. Irgend eine Aufklärung über die Function der Nebennieren haben uns allerdings die Experimente von Brown-Sequard nicht gebracht.

Bedeutend mehr leistet hier die in neuester Zeit von Jacoby[2]) veröffentlichte hochinteressante Arbeit, nach welcher den Nebennieren eine bis jetzt vollständig unbekannte Function zuzuerkennen wäre. Er hält die Nebennieren für hauptsächlich nervöse Organe, welche die Peristaltik des Darms in der Weise beeinflussen, dass sie dieselbe hemmmen. Nach ihrer Exstirpation werden durch Vagusreizung stürmische Darmbewegungen ausgelöst, welche bei Vagusreizung allein ohne Entfernung der Nebennieren ausbleiben. Die Reizung der Nebenniere oder der Nerven, welche von ihr zum Gangl.

[1]) Compt. rend. 1857, Th. II, S. 1036.

[2]) Archiv f. experiment. Patholog. u. Pharmakol., Bd. XXIV, S. 171.

coeliac. ziehen, setzt den in Bewegung befindlichen Darm unmittelbar zur Ruhe. Ferner fand Jacoby, dass ihre Reizung die Secretionsgeschwindigkeit der Niere bedeutend herabsetzt. Die Wirkung von Giften, welche die Peristaltik stark anregen, wird durch Nebennierenreizung aufgehoben.

Die Nebennieren wurden nun auch vielfach chemisch untersucht und die darüber erschienenen Publikationen berichten von mehreren Körpern, welche in ihnen zu finden seien.

Zuerst hat man in ihrer Marksubstanz neben Eiweisskörpern ein oder mehrere Chromogene gefunden. Cloëz und Vulpian, Krukenberg, Virchow u. A. beschreiben uns die Reactionen dieses Körpers; er besitzt die Eigenschaft, sich unter dem Einfluss verschiedener Agentien charakteristisch zu färben. So macht wässerige Jodlösung, Chlor- und Bromwasser eine carminrothe Färbung; dasselbe bewirkt die Mehrzahl der oxydirenden Stoffe, ferner der Sauerstoff der Luft und das Sonnenlicht, wenn es auf den Wasserauszug der Medullarsubstanz einwirkt. Extrahirt man die Nebennieren mit verdünnter Salzsäure, so färbt sich dieser Auszug bei Zusatz von überschüssigem Ammoniak schön roth. Die Substanz, welche diese Färbungen bewirkt, ist in sehr verdünnten Säuren löslich, so auch in Essigsäure und zwar sind die Säurelösungen gelb, bei Zusatz von Ammoniak scheidet sich die ganze Menge des Farbstoffes in violetten Flocken ab, was auf eine basische Natur des Farbstoffes hinweist (Holm[1]). Unlöslich ist dieser Farbstoff nach Holm und Hoppe-Seyler in Alkohol, Aether, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Benzol; Alkalien nehmen nur wenig von ihm auf. Isolirt und rein dargestellt, hat man diesen Körper noch nicht; nach Virchow[2]) sind nicht die morphologischen Elemente Träger der Farbe, sondern der Farbstoff ist in der Intercellularflüssigkeit enthalten, was er an mikroskopischen Präparaten durch die Jodreaction bewiesen hat.

Dieser Farbstoff mit seinen Eigenschaften ist hier angeführt, weil bei den folgenden Untersuchungen auf Gallensäuren

---

[1]) Journal f. pract. Chemie, Bd. C, S. 152.

[2]) Virchow's Archiv, Bd. XII, S. 482.

eine Farbenreaction zur Anwendung kam, welche ebenfalls roth gefärbte Produkte lieferte. Bei der Untersuchung der Nebennieren auf Hippursäure muss noch einmal auf dieses Chromogen zurückgekommen werden.

Ferner fand man in den Nebennieren: Eiweiss, Substanzen des Bindegewebes, Salze, von denen Cloëz und Vulpian als besonders reichlich Chlorkalium angeben, dann auch Chlornatrium und Phosphate. Ferner Fette, welche in grosser Menge vorhanden sind. Man sieht beim Erwärmen einer zerriebenen Masse von Nebennieren auf der Flüssigkeit sehr grosse, intensiv gelbe Tropfen sich abscheiden, die bei gewöhnlicher Temperatur erstarren. Dieses Fett geht nach Virchow[1]) durch Einwirkung von Schwefelsäure Farbenveränderungen ein, welche den bei der später zu beschreibenden Furfurolreaction in Verbindung mit Gallensäuren auftretenden sehr ähnlich sind. Die gelbe Farbe des Fettes geht dabei in roth und weiterhin in dunkelblau über.

Ferner fand man in den Nebennieren Lecithin, Neurin, Glycerinphosphorsänre und Leucin, welch' Letzteres von Hammarsten[2]) für ein Zersetzungsprodukt gehalten wird. Virchow[3]) dagegen spricht von sehr reichlichen Leucinmengen; er sagt: «Schon die schön violette Lösung, welche man in dem ausgezogenen Safte durch Kali und Kupfersulphat erhält, deutet darauf hin». Es fand jedoch Holm[4]) nur sehr wenig Leucin, Seligsohn[5]) gar keins. Nach Külz[6]) enthalten die Nebennieren Inosit.

1857 veröffentlichten Cloëz und Vulpian[7]) eine Arbeit, in welcher sie die Anwesenheit von Taurocholsäure, Taurin

---

[1]) Virchow's Archiv, Bd. XII, S. 104.

[2]) Lehrbuch der physiolog. Chemie.

[3]) Virchows Archiv, Bd. XII, S. 483.

[4]) Journal für pract. Chemie, Bd. C., S. 151.

[5]) De pigmenti patholog. ac morb. Addis., adject. chemic. glandul. supraren. Dissert. Berlin 1858.

[6]) Sitzungsber. d. Marburger Gesellschaft zur Beförder. d. ges. Naturwiss. 1876, Nr. 4. Citirt nach Hoppe-Seyler, Physiolog. Chemie 1881, S. 722.

[7]) Note sur l'existence des acides hippurique et choléïque dans les capsules surrécules des animaux herbivores. Compt. rend. T. II, 1857.

und Hippursäure in den Nebennieren des Hammels nachgewiesen haben wollten.

Auch Virchow ist geneigt, die Existenz von Gallensäuren in den Nebennieren anzunehmen. Er sagt[1]) aber: »Die Anwesenheit von Gallenstoffen in den Nebennieren muss insofern mit einiger Vorsicht aufgenommen werden, als die unmittelbare Nähe der Leber und der Gallenblase für die rechte Nebenniere wenigstens die Imbibition sehr begünstigt». Auch Hoppe-Seyler[2]) macht den Einwurf, dass Hippursäure und Benzoësäure von den Nieren, Taurocholsäure von der Gallenblase oder Leber her durch Imbibition ins Nebennierengewebe eingedrungen sein könnten. Für die vorliegenden Versuche kann dieser Einwand wohl zurückgewiesen werden, da die Nebennieren dem eben getödteten, noch warmen Thier entnommen wurden, so dass von einer stattgehabten Imbibition nicht die Rede sein konnte.

Virchow fährt dann weiter fort: «Indess war es mir auch schon aufgefallen, dass ich durch Digestion menschlicher, mit aller Vorsicht gesammelter und präparirter Nebennieren eine Flüssigkeit erhielt, die nach dem Filtriren eine eigenthümliche, bald gelbe, bald röthlich-braune Farbe zeigte und bei dem Verdampfen sich mit dunkelviolettbraunen Häuten überzog. Dieselbe gab, nachdem sie etwas eingeengt war, die Pettenkofer'sche Probe sehr schön und nahm mit Mineralsäuren, besonders mit Salpetersäure, eine grünliche Färbung an».

Virchow hat hier nichts von der Entfernung der Eiweissstoffe und Fette aus der Macerationsflüssigkeit gesagt, und daher ist bei ihm der positive Ausfall der Pettenkoferschen Reaction, der die Anwesenheit von Gallensäuren darthun sollte, nicht beweisend.

Ueber das Vorkommen schwefelhaltiger Stoffe in den Nebennieren sagt Virchow weiterhin: «Die rosige Farbe, welche das Jod erzeugt, erinnert etwas an das freilich brillantere Violett, welche Jod in Schwefelkohlenstoff hervorbringt

---

[1]) Virchow's Archiv, Bd. XII, S. 481.
[2]) Lehrb. d. physiol. Chemie 1881.

und auch die intensiv grüne Farbe der Eisensalze könnte auf eine Schwefelverbindung hindeuten. Indess deuteten andere Reactionen weder Schwefelkohlenstoff noch Schwefelwasserstoff als solche in dem Safte an und obwohl sich die Substanz ziemlich lange erhält, so ist doch die Reaction um so zuverlässiger, je frischer die Organe sind. Ich lasse es daher dahingestellt, ob diese Reactionen irgend etwas mit dem Taurin zu thun haben».

Die Existenz von Taurin und Benzoësäure in den Nebennieren wurde noch weiterhin von einigen Untersuchern behauptet; so von Seligsohn[1]). Taurin allein fand Holm[2]).

Es sollten durch die folgenden Untersuchungen an der Hand neuerer und schärferer Methoden die Angaben der obigen Autoren über die Anwesenheit von Gallensäuren, Hippursäure und Benzoësäure in den Nebennieren einer erneuten Prüfung unterzogen werden. Einige Angaben und Bemerkungen über die Reactionen der Gallensäuren und die angewandten Untersuchungsmethoden müssen vorausgeschickt werden. Bevor ich jedoch über diese berichte, müssen zuerst die Reactionen der Gallensäuren und die Untersuchungsmethode, welche angewandt wurden, kurz besprochen werden.

Reactionen der Gallensäuren.

Schon seit längerer Zeit ist die Pettenkofer'sche Reaction zum Nachweise von Gallensäuren bekannt. Eine genauere Beschreibung derselben ist wohl unnöthig. Bei Anwesenheit von Gallensäuren entsteht dabei eine kirschrothe Färbung, welche bald heller, bald dunkler ausfällt. Dieselbe oder wenigstens eine sehr ähnliche Reaction geben aber noch einige andere Körper, von denen besonders die Eiweissstoffe wichtig sind, ferner auch Oele, verschiedene Harze, Cholestearin, Amylalkohol, Harnstoff, höhere Fettsäuren etc.[3]). Es sind daher solche Stoffe vor Anstellung der Reaction aus der zu untersuchenden Flüssigkeit zu entfernen.

---

[1]) S. o. «De Pigment, pathol.» Diss.

[2]) S. o.

[3]) Kunde, Inauguraldiss., Berlin 1850; E. Bischoff, Zeitschr. f. ration. Medicin. Bd. XXI, S. 125.

Diese Pettenkofer'sche Reaction beruht nach den Untersuchungen von Mylius[1]) und Udránszky[2]) auf der Einwirkung des Furfurols. Dasselbe wird nach Döbereiner aus Zucker, Schwefelsäure und Braunstein gebildet, nach Emmet[3]) auch aus Zucker und Schwefelsäure allein. Es wird demnach bei der Pettenkofer'schen Reaction aus dem Rohrzucker und der Schwefelsäure Furfurol abgespalten, welches mit Gallensäuren Farbproducte gibt. Löst man einen Tropfen Furfurol in 10 cbcm. Wasser, so genügt ein Tropfen der Lösung, um eine Mischung von Cholsäure, Wasser und Schwefelsäure blutroth zu färben. Dieses Roth hat oft einen verschiedenen Farbenton, geht dann später in Violett und zuletzt in Blau über; diese Blaufärbung wird von einigen Autoren als entscheidend für Gallensäuren angesehen. Es gelang mir auch, die blaue Farbe sofort entstehen zu lassen, wenn ich Furfurolwasser im Ueberschuss auf eine weingeistige Lösung von Glycocholsäure und concentrirter Schwefelsäure einwirken liess. Das Furfurol wird nach Udránszky's Angabe[4]) am besten in einer 0,5proc. Wasserlösung zur Reaction verwandt, da eine zu concentrirte wässerige Furfurollösung mit concentrirter Schwefelsäure auch ohne Gallensäurezusatz eine Rothfärbung gibt. Durch die Arbeit Udránszky's haben wir eine äusserst empfindliche Reaction auf Gallensäuren kennen gelernt; nach ihm schwankt die geringste Menge von Cholsäure, die mit ihrer Hilfe noch nachgewiesen werden kann, zwischen 0,000033 und 0,00005.

Die Farbenreaction der Pettenkofer'schen Reaction wurde von Bogomoloff und Schenk[5]) spektroskopisch untersucht und dieselben fanden 2 charakteristische Absorptionsstreifen, einen in F, an der Grenze zwischen Grün und Blau und einen zweiten, bedeutend schwächeren bei D. Udránszky fand weiter, dass die geringste Menge von Gallensäuren, welche

---

[1]) Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. XI, S. 492.

[2]) Ibidem, Bd. XII, S. 355: über Furfurolreactionen.

[3]) Journal f. pract. Chemie, Bd. 12, S. 120.

[4]) L. c.

[5]) Maly's Jahresber. üb. d. Fortschritte d. Thierchemie, Bd. II, S. 232.

noch die Streifen liefern, 0,00005 beträgt. Es ist dabei hier zu bemerken, dass Udránszky bei seinen Versuchen reine weingeistige Cholsäurelösung anwandte, und die Gallensäuren nicht erst, wie hier, aus thierischen Geweben isoliren musste. Dass dabei ein wenn auch geringer Verlust an Gallensäuren eintreten musste, ist leicht verständlich, wie dies weiter unten bei den Vorversuchen beschrieben werden soll.

Die spektroskopische Untersuchung ist wichtig, da sie nach Schenk[1]) die Gallensäuren von manchen anderen Körpern unterscheiden lässt, besonders von Eiweissstoffen, welche unter den gleichen Verhältnissen sehr ähnliche Färbungen liefern können. Sie tritt jedoch an Empfindlichkeit gegen die gewöhnliche Furfurolreaction zurück, indem nur bei einer etwas stärkeren Concentration die Absorptionsstreifen hervortreten. Anfangs ist nur der breite Streifen in F sichtbar, bei zunehmender Concentration tritt auch der Streifen bei D hervor. Bei noch stärkerer Concentration ist nur noch der Streifen in D sichtbar, da von F an alles verdunkelt ist. Dasselbe geschieht, wenn die rothgefärbte Flüssigkeit, welche nur den Streifen in F gab, einige Zeit gestanden und dabei nachgedunkelt ist. Die spektroskop. Untersuchung ist mit Erfolg nur an rothgefärbten Reactionslösungen anzustellen, sind diese vollständig violett oder blau geworden, so sind keine Streifen mehr aufzufinden.

Die Furfurolreaction wurde in der Weise angestellt, dass eine geringe Menge der zu untersuchenden filtrirten alkoholischen Lösung, mit einem Tropfen Furfurolwasser versetzt, ein wenig concentrirte Schwefelsäure hinzugefügt und die Mischung auf dem Wasserbade ganz wenig erwärmt ward. Ein anderer Theil der zu untersuchenden alkoholischen Lösung wurde in ein Reagenzgläschen geschüttet, ein Tropfen Furfurolwasser und ebensoviel concentrirte Schwefelsäure hinzugefügt, als alkoholische Lösung genommen war. Bei Anwesenheit von Gallensäuren bildete sich an der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten ein rother Ring und beim Umschütteln nahm die ganze Mischung die rothe Farbe an. In ein Gläschen

[1]) Anat. physiol. Untersuchungen. Wien 1872, S. 47.

mit parallelen Wänden gebracht, wurde die farbige Lösung dann spektroskopirt.

Untersuchungsmethode.

Es musste nun zunächst ein Gang der Untersuchung gefunden werden, mit Hilfe dessen die kleinsten Quantitäten Gallensäuren, die einem thierischen Gewebe beigemengt waren, mit Sicherheit nachgewiesen werden konnten. Um die gleich näher zu beschreibende Methode auf ihre Genauigkeit zu prüfen, wurde eine Reihe von Vorversuchen mit Milzgewebe angestellt. Obgleich in diesem Organ die Abwesenheit von gallensauren Salzen vorausgesetzt werden konnte, so wurde diese Annahme doch noch durch einen speciellen Controllversuch als richtig erwiesen.

Die Methode war folgende:

Die Milz wurde mit Scheere und Messer möglichst zerkleinert, ein gewisses Quantum des Milzbreies abgewogen und mit einer genau gewogenen Menge eines gallensauren Salzes durch Verreiben in einer Porzellanschale gründlich vermengt. Darauf wurde das Gemisch mit warmem Wasser übergossen, nochmals verrieben und dann durch ein zusammengefaltetes Mousselintuch in eine Abdampfschale durchgepresst. Die im Tuche gebliebenen Organreste wurden wieder in die Reibschale gebracht, von neuem mit heissem Wasser übergossen, zerrieben und die Macerationsflüssigkeit durchgepresst. Dies Verfahren wurde 5 Mal wiederholt. Die auf diese Weise gewonnene Extractionsflüssigkeit war röthlich trübe, reagirte neutral, resp. amphoter, und es galt nun, aus derselben die Eiweisskörper zu entfernen, deren Anwesenheit das Anstellen der Pettenkofer'schen Reaction illusorisch gemacht hätte.

Dies geschah durch Kochen und Ansäuern. Das Enteiweissen machte oft grosse Mühe, da die abfiltrirten Proben oft noch nach langer Behandlung Spuren von Eiweiss aufwiesen. Nachdem das Eiweiss vollständig entfernt war, wurde heiss durch ein Faltenfilter filtrirt. Das Filtriren ging, falls kein Eiweiss mehr in Lösung war, rasch von Statten; das Filtrat war eine hellgelbe klare Flüssigkeit. Diese wurde nun mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaction versetzt und mit einer

Lösung von basisch essigsaurem Blei gefällt. Es entstand ein leicht gelblich gefärbter, feinflockiger Niederschlag, der sich langsam absetzte. Die überstehende Flüssigkeit wurde decantirt und ihr Ammoniak und bas. essigsaures Blei zugesetzt, um noch eine etwaige Bleifällung zu erlangen, die dann dem ersten Bleiniederschlage zugefügt wurde. Die abfiltrirten Niederschläge wurden dann mehrmals auf dem Filter mit Wasser ausgewaschen, zur Beseitigung vorhandener Farbstoffe, des Weiteren wurde dann nach der von Hoppe-Seyler[1]) angegebenen Methode zum Nachweis kleiner Mengen Gallensäuren verfahren. War der Bleiniederschlag nicht sehr gut mit Wasser ausgewaschen worden, so schieden sich nach der späteren Alkoholextraction beim Verdampfen des Alkohols an den Rändern der Schale bräunliche Ringe ab, die jedoch, wie dies die Versuche mit Milz ohne Gallensäurenzusatz ergeben, keinen Einfluss auf die Furfurolreaction haben. Die Extraction des Bleiniederschlages mit 96 % Alkohol wurde im Ganzen 4 Mal vorgenommen. Die vereinigten Filtrate mit einigen Tropfen Natr. carbon. zur Trockne verdunstet. Der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahirt, auf kleines Volumen eingedampft, filtrirt, aus dem Filtrate nach Abkühlen desselben die gallensauren Salze mit Aether gefällt. Dabei wurde die Flüssigkeit milchig trübe und nach 24 Stunden hatten sich die Gallensäuren, wenn sie in grösserer Menge zugesetzt waren, als harziger, gelber Niederschlag auf dem Boden des Glases gesammelt. Waren gallensaure Salze dem Milzgewebe in geringer Menge zugesetzt, so resultirte am Boden eine weisse Fällung. Ein harziger Niederschlag wurde in diesen Fällen nicht erhalten. Der überstehende Aetheralkohol wurde abfiltrirt und nach Verdunsten desselben der Rückstand mit heissem Alkohol aufgenommen, filtrirt, mit dem Filtrat die Pettenkofer'sche und die Furfurolreaction angestellt und zwar hier wie auch in allen übrigen Fällen stets beide nebeneinander. Das Hauptaugenmerk wurde natürlich auf die durch Aether hervorgebrachte Fällung gerichtet, da hauptsächlich hier die Gallensäuren sich finden. Dieselbe wurde zugleich

[1]) Handbuch der physiolog. u. pathol. Chemie.

mit den abfiltrirten im Aetheralkohol flottirenden Flocken, die sich manchmal darin fanden, mit warmem 95% Alkohol aufgenommen, filtrirt, das Filtrat zur Trockne verdampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol aufgenommen und nun die Reactionen angestellt.

Bei dieser Methode konnten nun geringe Mengen von Gallensäuren verloren gehen und es mussten speciell untersucht werden:

1. Der Organrückstand, welcher in dem Tuche zurückgeblieben war;
2. das auf dem Faltenfilter gesammelte Eiweisscoagulum, welches nach dem Enteiweissen des durchgepressten Wasserauszuges des Organes nachgeblieben war;
3. das Mousselintuch, das eventuell beim Durchpressen noch einige Spuren von Gallensäuren zurückbehalten haben konnte.

1. Der Organrückstand wurde aus dem Tuche abgeschabt, in ein Becherglas gethan, und mehrfach mit 95% Alkohol extrahirt. Die Filtrate waren Anfangs klar, trübten sich aber später durch in der Kälte ausgeschiedenes Fett. Sämmtliche Filtrate wurden vereinigt und mit A bezeichnet.

2. Das Eiweisscoagulum wurde genau in derselben Weise behandelt wie der Organrückstand, die Alkoholfiltrate, die sich auch in der Kälte ein wenig trübten, wurden sub B aufbewahrt.

3. Das Mousselintuch wurde nicht mit Alkohol, sondern mit Wasser mehrmals ausgekocht, das Filtrat enteiweisst, filtrirt, das Filtrat nach Zusatz von Ammoniak mit Bleiessig gefällt und dann weiter wie die Alkoholfiltrate A, B und C behandelt. Das Eiweisscoagulum selbst mit Alkohol ausgekocht, filtrirt und den Alkoholfiltraten A und B als C. hinzugefügt. Alle 3 zusammen wurden zur Trockne verdampft, wobei eine dicke, klebrige, dunkelbräunliche Masse zurückblieb, diese dann, um Fett und Eiweiss zu entfernen, mit heissem Wasser extrahirt, filtrirt, mit Ammoniak versetzt, mit basisch essigsaurem Blei gefällt. Der Bleiniederschlag mit Alkohol ausgekocht, filtrirt, das Filtrat mit Zusatz von etwas kohlensaurem Natron zur Trockne verdampft, der Rückstand mit ab-

solutem Alkohol aufgenommen, dieser abfiltrirt, das auf kleines Volumen gebrachte und abgekühlte Filtrat mit Aether gefällt.

Somit wurden bei jedem Versuche 2 Aetherfällungen und 2 Verdunstungsrückstände des von den Aetherniederschlägen abfiltrirten Aetheralkohols erhalten. Bei den Prüfungen dieser Methode, welche in der Weise angestellt wurden, dass der Milz kleine Mengen von Gallensäuren zugefügt wurden, ergaben sich nach langem Herumprobiren einige Abänderungen als praktisch wichtig, die gleich zu beschreiben sein werden.

Wurde die Milz ohne Zusatz von Gallensäure verarbeitet, so ergab dann schliesslich die Furfurolreaction nur eine schwache bräunliche Färbung oder keine Spur der rothen charakteristischen Reaction und natürlich auch nicht das entsprechende Spectrum. Bei Hinzufügen einer geringen Menge unreiner Gallensäuren vom Hunde zur zerkleinerten Rindermilz ergab sich in der Aetherfällung ein harziger gelber Niederschlag, welcher alle Reactionen der Gallensäuren darbot.

Bei diesen Vorversuchen konnte auch die Genauigkeit der oben beschriebenen Methode geprüft werden. Das Mousselintuch musste 2 Mal mit Wasser ausgekocht werden. Die späteren Extractionen ergaben keinen weiteren Gehalt an Gallensäuren.

Für den Organrückstand und die Eiweisscoagula (d. h. 1 und 2) ergab es sich als das Beste, dieselben auf dem Wasserbade zu trocknen, dann zu pulvern und nun 2 Mal mit absolutem Alkohol zu extrahiren. So blieben alle Eiweisskörper zurück. Die Fette wurden in der Weise entfernt, dass der abfiltrirte Alkohol zur Trockne verdampft, der Rückstand mit heissem Wasser aufgenommen, filtrirt und das Filtrat dann, wie oben beschrieben, behandelt wurde.

Der zu den Extractionen verwandte Alkohol muss nach der Angabe von Udránszky frei von Amylalkohol sein, da dieser die Furfurolreaction gibt, wie denn überhaupt Rohspirituosen Furfurol enthalten und daher mit concentrirter Schwefelsäure Farbprodukte geben.

Um die Leistungsfähigkeit der Methode zu prüfen, wurden genaue Versuche mit abgewogenen Mengen von Milzbrei und

reinen gallensauren Salzen angestellt und zwar mit glycocholsaurem und taurocholsaurem Natron.

50,0 Milz mit 0,25 Natr. glycocholic. (d. h. 0,5 %) wurde in der beschriebenen Weise behandelt. Die schliesslich erhaltenen Aetherniederschläge gaben die schönste Pettenkofer'sche und Furfurolreaction. Bei der Spectraluntersuchung zeigten sich die beiden charakteristischen Absorptionsstreifen. Nicht nur in diesem Versuche, sondern auch in den übrigen, bei denen irgendwie erheblichere Mengen gallensaurer Salze dem Milzgewebe zugesetzt waren, gab auch der Rückstand nach Verdunsten des Aetheralkohols eine schwache Furfurolreaction.

Mit gleichem positiven Erfolge wurden auch folgende Gemische untersucht:

50,0 Milz und 0,125 = 0,25 %,
50,0 » » 0,062 = 0,12 %,
50,0 » » 0,03 = 0,06 %,
50,0 » » 0,015 = 0,03 %.

Bei dem letzten Versuche und den folgenden ergab die Furfurolreaction nicht sofort das charakteristische Spectrum. Die Linie F trat zwar deutlich hervor, jedoch nicht die bei D. Es dauerte jedoch nur kurze Zeit, bis auch der zweite Streifen erschien, indem die Farbenreaction bald nachdunkelte. Noch mehr Interesse haben die letzten Versuche mit 3 mgr., 1 mgr. und 0,5 mgr. Natr. glycocholic. je zu 50,0 Milz:

a) 50,0 Milz und 0,003 Natr. glycochol. = 0,006 %.
Auch hier war deutliche Furfurolreaction zu erzielen; das Spectrum zeigte jedoch nur den Streifen bei F und erst nach 24stündigem Stehen der zum Spectroscopiren verwendeten rothen Mischung trat ein schwacher Streifen bei D auf. Es muss hier nochmals betont werden, dass der Zusatz des Furfurolwassers vorsichtig zu geschehen hat, da bei zu viel Furfurol bald vollständige Violettfärbung eintritt, bei welcher kein Spectrum aufzufinden ist.

b) 50,0 Milz und 0,001 Natr. glycocholic. = 0,012 %.
Auch hier trat schliesslich deutliche, wenn auch nicht intensive Furfurolreaction auf, ein charakteristisches Spectrum konnte jedoch bei diesem Versuche nicht mehr wahrgenommen werden, was bei diesem Verdünnungsgrade auch nicht wunder nehmen kann. Udránszky hat bei sehr geringen Gallensäuremengen gleichfalls zwar Reaction, aber kein Spectrum mehr erhalten. Nach ihm ist die Grenze für den spectroscopischen Nachweis 0,00005.

c) 50,0 Milz und 0,0005 Natr. glycocholic. = 0,001 %.
Auch hier war schwache, aber deutliche Reaction, jedoch kein Spectrum, zu erhalten.

Die Versuche mit Natr. taurocholicum verliefen ganz analog.

Die beiden Salze machen keinen Unterschied in der Pettenkofer'schen und in der Furfurolreaction. Das taurocholsaure Natron lässt sich ebenso sicher dem Gemische entziehen und nachweisen wie das glycochols. Natron.

Es kamen zur Untersuchung:

50,0	Milz	und 0,125	Natr.	taurocholic.
50,0	»	» 0,062	»	»
50,0	»	» 0,03	»	»
50,0	»	» 0,015	»	»
50,0	»	» 0,003	»	»
50,0	»	» 0,001	»	»
50,0	»	» 0,0005	»	»

Da die Versuche genau so verliefen, wie mit Natr. glycocholicum, kann die nähere Beschreibung der Resultate unterlassen werden. Es schien, als ob beim Nachdunkeln hier der 2. Streifen bei D rascher auftrat als beim Natr. glycocholic., jedoch kann das nicht bestimmt behauptet werden.

Wie aus diesen Versuchen zu ersehen ist, besitzen wir in der Furfurolreaction ein sehr empfindliches Mittel zum Nachweis von Gallensäuren und zugleich zeigt die hier befolgte Methode, dass wir mit derselben noch äusserst geringe Mengen von Gallensäuren thierischen Geweben entziehen und deutlich nachweisen können. Wenn Mylius und Udránszky als die geringste Menge noch nachweisbarer Gallensäuren die Zahl 0,000033 angeben, so haben in unseren Versuchen beim Nachweis von noch 0,0005 keine zu grossen Verluste stattgefunden, die bei einer immerhin umständlichen Isolirung wohl kaum zu vermeiden sind, während jene Autoren mit reinen weingeistigen Cholsäurelösungen arbeiteten.

Versuche mit Nebennieren.

Benutzt wurden zu diesen Untersuchungen die Nebennieren des Menschen, des Hundes und namentlich die des Rindes, welche letztere in grösserer Menge zu erhalten waren. Da der Nachweis von Gallensäuren in denselben nicht gelang, die Resultate also

negative sind, so will ich mich hier kurz fassen. Gearbeitet wurde genau nach der früheren Methode, deren Ausführung bei den Nebennieren bedeutend leichter ist, als sie bei den Vorversuchen mit der Milz war, da die Eiweissmengen, die hier fortzuschaffen sind, viel geringer sind, als bei der blutreichen Milz.

Was die Versuche mit der Nebenniere des Menschen anbetrifft, so stand leider wenig Material zur Verfügung und es ist durch den negativen Ausfall der Untersuchungen hier die Abwesenheit von Gallensäuren wohl nicht sicher bewiesen, wenngleich sehr wahrscheinlich gemacht.

Dagegen waren grössere Quantitäten Hunde- und Rindernebennieren zu erhalten. Da nur wenige Nebennieren vom Hunde auf einmal zu bekommen waren, so mussten, um mehr Versuchsmaterial zu haben, dieselben in eine Form gebracht werden, bei welcher Fäulniss und eventueller Gallensäureverlust unmöglich war. Desshalb wurden die Bleiniederschläge gesammelt, die Organrückstände und Eiweisscoagula in absolutem Alkohol aufbewahrt, bis eine genügende Menge derselben vorhanden war, um die Versuche anzustellen. Wie gesagt, fielen dieselben negativ aus und somit kann die Anwesenheit von Gallensäuren in den Nebennieren der Carnivoren bestritten werden.

Auch beim Verarbeiten von 50,0 Nebennieren des Rindes wurde keine Furfurolreaction erhalten, sondern nur eine hellbräunliche Flüssigkeit, deren Farbe lediglich durch die Einwirkung der concentrirten Schwefelsäure hervorgebracht sein konnte. Da die Quantität von 50,0 Nebennieren vielleicht noch zu gering war, wurde noch je ein Versuch mit 100,0 und 200,0, jedoch mit dem früheren Erfolge gemacht.

Es kann deshalb, in Anbetracht der Empfindlichkeit der Reaction und gestützt auf die Vorversuche, welche noch einen Gallensäurenachweis von 0,001 % ermöglichten, die Ansicht der genannten Autoren über das Vorkommen von Gallensäuren nicht acceptirt, sondern die Behauptung aufgestellt werden, dass weder Carni- noch Herbivoren in ihren Nebennieren Gallensäuren enthalten.

Selbst wenn bei diesen Versuchen eine Rothfärbung aufgetreten wäre, die aber thatsächlich fehlte, so könnte man

daraus nicht ohne Weiteres auf die Gegenwart von Gallensäuren schliessen, da auch das in den Nebennieren enthaltene Chromogen, welches rothe Farbproducte liefert, die Reaction hätte vortäuschen können. Allerdings hätte es sich auch nur um ganz geringe Mengen dieses Chromogens handeln können, da der rothe Farbstoff desselben in Alkohol unlöslich ist[1]). Dass Virchow nach Eindampfen des wässrigen Extractes durch Zucker und Schwefelsäure ein positives Resultat erhielt, ist leicht verständlich, da er von Eliminiren der Fette und Eiweisskörper nicht redet und somit wahrscheinlich diese die Reaction hervorgerufen haben. Cloëz und Vulpian geben uns keine Reaction der Gallensäuren an, die Pettenkofer'sche ist bei ihnen gar nicht erwähnt, auch für das von ihnen gefundene Taurin geben sie uns keinen Beweis. Auch Holm sagt nur kurz: «Das Filtrat lieferte Taurin».

Es darf hier erwähnt werden, dass bei diesen Versuchen auch der schön roth gefärbte Farbstoff der Nebennieren auftrat; beim Alkalisiren des enteiweissten wässrigen Extractes ging dessen hellgelbe Farbe in roth über. Wurde nun mit Bleiessig gefällt und der Niederschlag abfiltrirt, so war das klare Filtrat schön roth gefärbt; durch den Spectralapparat betrachtet zeigten sich jedoch keine Streifen und es hat somit diese Rothfärbung nichts Gemeinsames mit der Färbung der Gallensäuren durch Furfurol.

Untersuchungen über Hippursäure und Benzoësäure.

Bei den Untersuchungen auf die Gegenwart von Hippursäure und Benzoësäure in den Nebennieren kam die Methode von Schmiedeberg und Bunge[2]) zur Anwendung, welche bis jetzt als die sicherste und genaueste anzusehen ist.

100 gr. vollständig frische Nebennieren vom Rinde wurden mit Scheere und Hackmesser so fein als möglich zerkleinert, mit Wasser von 45° C. mehrere Male extrahirt, durch ein Mousselintuch gepresst. Eine höhere Temperatur des Wassers

---

[1]) Hoppe-Seyler, Lehrbuch d. physiol. Chemie und Holm: Journal für pract. Chemie, Bd. C.

[2]) Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmak., Bd. VI, S. 233.

war zu vermeiden, um nicht durch Aufnahme leimartiger Substanzen gestört zu werden, vor denen Schmiedeberg und Bunge warnen. Das wässrige Extract wurde auf dem Wasserbade auf ein kleineres Volumen eingedampft und enteiweisst. Dass dabei vorhandene Hippursäure nicht Zersetzungen erleidet, haben die genannten Autoren festgestellt. Das Eiweiss wurde dann abfiltrirt, das Filtrat, welches eine hellgelbe Farbe hatte, mit einer Lösung von Natr. carbonic. alkalisch gemacht. Auch hier trat durch das Alkali dieselbe Rothfärbung der Flüssigkeit ein, die früher bei Untersuchung der Nebennieren auf Gallensäuren beschrieben ist.

Das alkalisch gemachte Filtrat wurde auf dem Dampfbade bis zur Syrupconsistenz eingeengt und weiterhin nach der Angabe von Bunge und Schmiedeberg verfahren. Also Aufnahme des Syrups mit viel absolutem Alkohol, Abfiltriren desselben, Eindampfen des alkohol. Filtrats, wobei allmälig Wasser zugesetzt wurde, bis aller Alkohol entwichen war. Diese wässrige Lösung, welche, stark mit Salzsäure angesäuert, nur eine sehr geringe Trübung gab, wurde dann filtrirt. Das saure Filtrat wurde mit Essigäther behandelt, dieser verdunstet, der Rückstand mit Petroleumäther behandelt, dieser abgegossen und zum Verdunsten gestellt, der Rückstand mit etwas Wasser aufgenommen. Die wässrige Lösung, welche auf Hippursäure untersucht werden sollte, gab nach tagelangem Stehen im Exsiccator keine Krystalle, obgleich nur wenige Tropfen nachgeblieben waren. Deshalb wurde der Weg eingeschlagen, auf welchem Bunge und Schmiedeberg die kleinsten Hippursäuremengen gefunden hatten.

Die wenigen Tropfen, die unter dem Exsiccator keine Krystallisation zeigen wollten, wurden mit Wasser verdünnt, mit etwas Zinkoxyd versetzt und auf dem Wasserbade erwärmt. Was sich von Zinksalzen gebildet und gelöst hatte, wurde abfiltrirt und das Filtrat beinahe bis zur Trockne eingedampft. Schmiedeberg und Bunge halten die Anwesenheit von Milchsäure, neben anderen organischen Säuren, als hauptsächlichstes Hinderniss für die Ausscheidung sehr kleiner Hippursäuremengen.

Es wurde deshalb das eingedampfte Filtrat mit Alkohol aufgenommen und filtrirt. Das in Alkohol unlösliche milchsaure Zink bleibt hierbei zurück, während das hippursaure Zink in Lösung geht.

Die alkoholische Lösung wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand in etwas Wasser gelöst, mit Salzsäure angesäuert und mit Essigäther ausgeschüttelt. Der von der sauren Lösung getrennte Essigäther wurde mit Wasser gewaschen und verdunstet, wobei sich am Boden des Glasschälchens einige helle Ringe absetzten. Der Rückstand wurde mit einigen Tropfen warmen Wassers aufgenommen. Nach dem langsamen Verdunsten desselben konnte auch mikroskopisch keine Spur von Hippursäurekrystallen aufgefunden werden.

Dass die Methode im Stande ist, auch sehr geringe Mengen Hippursäure, vermengt mit thierischen Geweben, nachzuweisen, zeigten uns Schmiedeberg und Bunge, welche 0,01 gr. Hippursäure zu einem Brei von 10 grossen, in kleine Stücke zertheilten Fröschen setzten; sie erhielten 0,0045 gr. reine Hippursäurekrystalle wieder.

Da aus 100 gr. Nebennieren auch nicht eine Spur Hippursäure erhalten wurde und ein nochmaliger Versuch mit 200 gr. ebenso resultatlos blieb, so darf aus diesen Untersuchungen im Gegensatz zu Cloëz und Vulpian der Schluss gezogen werden, dass die Nebennieren keine Hippursäure enthalten.

Um auf Benzoësäure zu untersuchen, wurde der Rückstand, welchen man nach obiger Methode mit der Extraction von Essigäther erhielt, mit Petroleumäther gewaschen und dieser zur Trockne verdunstet. Petroleumäther trennt Fett und Benzoësäure von Hippursäure. Der Rückstand wurde nach Verdunsten des Petroleumäthers mit wenig Wasser aufgenommen, das Fett abfiltrirt, das wässrige Filtrat bei Zimmertemperatur der Verdunstung überlassen. Im Rückstande konnte keine Benzoësäure nachgewiesen werden. Das Ergebniss dieser Untersuchungen kann daher kurz in den Satz zusammengefasst werden:

Die Nebennieren enthalten weder Gallensäuren noch Hippursäure, noch Benzoësäure.

Ueber Rhodan im Mageninhalt, zugleich ein Beitrag zum Uffelmann'schen Milchsäure-Reagens und zur Prüfung auf Fettsäuren.

Von

Dr. Georg Kelling, Assistenten der Poliklinik.

(Aus der Dr. J. Boas'schen Poliklinik für Magen- und Darmkranke in Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 17. August 1893.)

Die Bedeutung der Milchsäure im Mageninhalt für die Diagnose des Magenkrebses ist von Dr. Boas entdeckt und mehrfach in seinen Arbeiten betont worden. Der genannte Autor bemerkte nun eines Tages, dass in einem Fall von zweifellosem Magenkrebs keine Uffelmann'sche Reaction, also keine Zeisiggelbfärbung, vorhanden war. Die Färbung fiel vielmehr dunkelbraun aus. Mit einer neuen sicheren Methode, die Dr. Boas in dem 1893er Jahrgang der Deutschen medicinischen Wochenschrift veröffentlicht, gelang es ihm trotzdem, erhebliche Mengen Milchsäure im obigen Mageninhalt nachzuweisen. Herr Dr. Boas forderte mich auf, zu untersuchen, durch welchen Stoff die Milchsäurereaction in diesem Falle verdeckt wurde, und die Erscheinung weiter zu verfolgen. Für diese Anregung zur vorliegenden Arbeit und für die Benutzung des reichen Patienten-Materials der Poliklinik möchte ich Herrn Dr. Boas an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Schlägt man die Lehrbücher der Magendiagnostik nach, um zu sehen, welche Stoffe Braunfärbung mit Uffelmann's Reagens ergeben, so findet man fast durchweg, wie in der vor Kurzem erschienenen Auflage von Ewald's «Klinik der Verdauungskrankheiten, in Bouveret's «Maladies de l'estomac» und anderen, nur fette Säuren, Buttersäure und Essigsäure,

angegeben. Eine einfache Ueberlegung konnte mich wenigstens soviel lehren, ob es wahrscheinlich oder unmöglich war, dass diese Braunfärbung von einer schwachen organischen Säure herrührte. In diesem Falle musste sie auf Zusatz einer stärkeren Mineralsäure, wie Salzsäure, verschwinden.

Das trat aber keineswegs ein. Sieht man sich nun nach den Stoffen um, welche mit Eisenchlorid eine in Salzsäure beständige Braunfärbung zeigen, so gibt es einen, für den dieses Verhalten charakteristisch ist, nämlich das Rhodan. Bekanntlich gründet sich die Rhodanreaction auch auf diese Eigenschaft.

Ich konnte nun mit dem Mageninhalt die Colasantische Reaction anstellen. Der Mageninhalt wurde mit Alkohol gefällt, filtrirt, das Filtrat verdunstet und der Rückstand in Wasser gelöst. Er gab mit Kupfersulfat eine smaragdgrüne Färbung. Damit war die Anwesenheit von Rhodan bewiesen. Dass Rhodan die Milchsäurereaction sehr leicht verdeckt, konnte an einer verdünnten Rhodanlösung mit Zusatz von Milchsäure leicht gezeigt werden. Ich begnügte mich damit nicht, sondern suchte nach einem Körper, welcher die Rhodanreaction verschwinden und die Milchsäurefärbung wieder hervortreten lässt. Das musste natürlich ein Metall sein, welches mit Rhodan eine ungefärbte festere Verbindung als Eisen eingeht; deren gibt es mehrere. Als sehr geeignetes Mittel erwies sich eine 10 proc. Sublimatlösung, von der ein oder einige Tropfen dem Mageninhalt zugesetzt, die Braunfärbung ganz verschwinden machen. Die Milchsäurefärbung beeinträchtigt Quecksilberchlorid nicht im geringsten. Nachträglich fand ich, dass auch im «Neuen Handwörterbuch der Chemie» von H. von Fehling zur Entfärbung von Rhodaneisen Quecksilberchlorid und Goldchlorid angegeben sind. Da Quecksilber mit Rhodan eine feste Verbindung eingeht, so würde es ganz interessant sein, einmal zu verfolgen, ob und in wieweit dieser Process im lebenden Körper zu Stande kommt, ob etwa bei Quecksilber-Intoxikation der Speichel noch mit Eisenchlorid Rhodanreaction gibt oder nicht. Derartige Untersuchungen an Syphilitischen, die mit Schmier-

oder Injectionscuren behandelt werden, anzustellen, behalte ich mir vor.

Ich habe nun ziemlich ein halbes Jahr lang etwa 200 Mageninhalte auf Rhodan untersucht; zu etwa 10 cbcm. Magenfiltrat gab ich einen Tropfen officinellen (10%) Liquor ferri sesquichlorati. Dann wurde mit 1—3 Tropfen Acidum muriaticum dil. angesäuert. Eine in der sauren Lösung beständige Rothbraun-, Braun- oder Gelbfärbung, welche auf Zusatz von Sublimatlösung verschwand, konnte mit Sicherheit auf Rhodan bezogen werden.

Eine Braunfärbung, selbst Rothbraunfärbung, habe ich nun häufig in gesunden Mägen und in allen Krankheitszuständen des Magens, Ectasie, Atonie, Carcinom, Ulcus, auch chronische Gastritis und Neurosen gefunden. Eine Braunfärbung durch fette Säuren habe ich auch nicht selten bei Ectasie und Carcinom gesehen. Leicht erhält man eine Rhodanreaction nach einem Morgens nüchtern gegebenen Probefrühstück. Fast constant tritt sie beim Magensaftfluss in den geringen Mengen nüchternen salzsauren Mageninhaltes ein. Es zeigte sich nun die eigenthümliche Erscheinung, dass in manchen mässig salzsäurehaltigen Mageninhalten, welche nach der Herausnahme eine schwache Rhodanreaction gaben, nach mehrstündigem Stehen eine viel stärkere Reaction auftrat. Dasselbe konnte ich auch an einigen nüchternen Mageninhalten und mehreren der freien Salzsäure baaren Mageninhalten der chronischen Gastritis constatiren, nachdem ich sie, mit Salzsäure versetzt, mehrere Stunden stehen liess. Bei einer Patientin, welche an Diabetes litt, wurde, um auf Pankreasfermente zu prüfen, in den nüchternen Magen 1 proc. Sodalösung gegossen. Danach wurde die Lebergegend massirt, und dann der in den Magen massirte Dünndarmsaft mit der Sonde herausgeholt. Es war ein zähes, galliges, alkalisches Sekret. Es ergab schwache Rhodanreaction. Eine Probe des Sekrets liess ich nun unverändert stehen; die andere nach Ansäuren mit Salzsäure. Die erstere ergab dieselbe schwache, die zweite Probe aber eine starke rothbraune Rhodanreaction. Ich habe dies Verhalten an der Patientin noch einmal con-

statiren können und noch an einer anderen Patientin mit Atonie des Magens. Bei Letzterer wurde aber vor der Massage keine Sodalösung in den Magen gegeben. Nun hat zwar Gscheidlen an Hunden nachgewiesen, dass die Speicheldrüsen die einzige Bildungsstätte des Rhodans sind. Ob das aber für den Menschen der Fall ist, schien mir nach obigen Beobachtungen einer Nachprüfung werth. Darin wurde ich noch durch einige andere Versuche bestärkt. Ich liess Patienten, deren Mageninhalt nach Probefrühstück eine starke Rhodanreaction ergab, sofort nach Herausnahme des Inhaltes eine zweite gleiche Semmel kauen und in ein Glas spucken. Der ausgepresste Speichel dieser Semmel zeigte nun eine viel geringere Reaction, als der Mageninhalt, bei welch' Letzterem doch noch eine Verdünnung durch das genossene Wasser hinzukam. Ich versuchte nun, ob sich Rhodan durch die Verdauung mit Pepsin-Salzsäure aus dem schwefelhaltigen Theil des Eiweisses oder Mucins abspaltet. Die Versuche fielen negativ aus. Ich erstreckte nun meine Untersuchungen auf die im Duodenum vorkommenden Drüsensekrete. Dass die Rhodanreaction mit der Galle in keinem Zusammenhang stand, war leicht nachzuweisen. Die Galle enthält keine irgendwie in Betracht kommenden Mengen von Rhodan. Was das Pankreassekret anbetrifft, so untersuchte ich sechs menschliche Pankreasdrüsen, für deren gütige Ueberlassung ich Herrn Geheimrath Virchow hiermit meinen besten Dank sage, vergeblich auf Rhodan. Drei frische Pankreasdrüsen geschlachteter Hunde waren ebenfalls rhodanfrei. Reiner Pankreassaft, ebenso wie Duodenalsekret, stand mir, da ich mir einen Hund mit entsprechender Fistel nicht verschaffen konnte, nicht zur Verfügung. Dass bei der Pankreas-Verdauung des Eiweisses Rhodan nicht abgespalten wird, wies ich der Vollständigkeit wegen nach. Es bestand nun auch noch die Möglichkeit, dass Rhodan von der Magenschleimhaut ausgeschieden wurde. Den Beweis dafür oder dagegen kann man einwurfsfrei nur an einem geeigneten Fall, an einem gastrotomirten mit vollständiger Oesophagus Stenose erbringen. Sonst besteht immer noch die Möglichkeit, dass das im Magen gefundene Rhodan

vom Mundspeichel herrührt. Wenn man nun auch von allen den erwähnten ausgeführten oder noch auszuführenden Versuchen mit Wahrscheinlichkeit voraussehen kann, dass sie negativ ausfallen, so haben sie doch in sofern eine Bedeutung, als sie eine Stütze dafür sind, dass das Verhalten des Rhodans im Magen lediglich seine Erklärung in den Eigenschaften des Speichels findet. Um dieses Verhalten zu verstehen, musste ich vorerst zwei Annahmen machen:

1. Der leergeschluckte Speichel musste mehr Rhodan enthalten, als der beim Kauen abgesonderte, denn sonst konnte nicht die Reaction nach Probefrühstück im Mageninhalt stärker ausfallen, als in dem einfach gekauten Milchbrod.

2. Es musste das Rhodan des Speichels in dèn Fällen, wo die Reaction nach Ansäuern mit Salzsäure erst nach längerem Stehen stärker wurde, in einer gewissen Weise gebunden sein.

Dass der leergeschluckte Speichel meist reicher an Rhodan ist, als der beim Kauen abgesonderte, konnte nachgewiesen werden. Der Patient musste unter Vermeidung des Sprechens, Kauens und Schluckens den Speichel, den er von Zeit zu Zeit sonst leer zu schlucken pflegte, in ein Gefäss spucken. Sofort danach musste er eine Semmel gut kauen und gleichfalls ausspucken. Der Speichel wurde nun der Semmel durch Auspressen entzogen. Zu gleichen Mengen beider Speichelsorten wurden gleiche Mengen Eisenchlorid und Salzsäure gesetzt. Der sonst leergeschluckte Speichel ergab eine viel stärkere Reaction als der beim Kauen abgesonderte. In einigen Fällen konnte ich das Verhalten noch viel drastischer nachweisen, indem ich die Patienten statt der Semmel ein Stück Holz oder Kork gut kauen liess. Auch hier war in der Mehrzahl der Fälle der beim Kauen abgesonderte Speichel rhodanärmer. Ob nun etwa ein Unterschied im Rhodan-Reichthum des Speichels zu verschiedenen Tagesstunden, etwa in einem Abhängigkeitsverhältniss zu den Mahlzeiten, besteht, habe ich, da es mich zu weit abgeführt haben würde, vorläufig nicht untersucht.

Für die Erscheinung nun, dass die Rhodanreaction oft mit der Zeit zunahm in Mageninhalten, welche mässig freie Salzsäure enthielten, und in den der freien Salzsäure baaren

Mageninhalten nach künstlichem Ansäuren, konnte ich in folgender Weise eine Erklärung finden. In einer Anzahl von Fällen habe ich den Speichel in erster Probe unverändert, in der anderen Probe mit Salzsäure stark angesäuert (auf etwa 5 cbcm. 1 Tropfen Acidum muriaticum purum) 24 Stunden stehen lassen. Die Rhodanreaction zeigte keine Farbendifferenzen zwischen beiden Proben. Die Veränderung musste also im Magen vor sich gehen. Als natürliche Base, welche das Rhodan fester als das Kalium zu binden vermag, ergibt sich der Kalk. Eine Säure nun, welche die Umsetzung des Rhodans von Kali an Kalk erleichtert, ist die Salzsäure. Der Process geht demnach in folgender Weise vor sich. Aus dem kohlensauren Kalk bildet sich im Magen Chlorcalcium. Chlorcalcium und Rhodankali setzen sich in Chlorkali und Rhodancalcium um. Aus Rhodancalcium gelingt es nun nicht gleich, durch Ansäuern mit Salzsäure das gesammte Rhodan abzuspalten, und fällt in Folge dessen die Färbung bei Eisenchloridreaction geringer aus. Eine dünne Rhodanlösung, welche mit einer bestimmten Menge Eisenchlorid und Salzsäure eine rothbraune Färbung gab, versetzte ich mit etwas Chlorcalcium und liess sie einige Zeit stehen. Danach war die Reaction mit derselben Menge Salzsäure und Eisenchlorid auffällig geringer, als im ersten Fall. Mit der Zeit nahm sie durch die Einwirkung der Salzsäure wieder zu. Ich probirte dies Verhalten noch in einer den Magenverhältnissen besser angepassten Weise. Gleiche Mengen Speichelproben wurden einige Stunden stehen gelassen, die eine unverändert, die andere mit verdünnter Salzsäure soweit versetzt, dass die Reaction neutral oder nur schwach sauer auf Lakmus war. Hierbei stiegen Kohlensäureblasen auf. Später ergab die zweite Probe eine schwächere Rhodanreaction als die erste; nach Zusatz starker Salzsäure nahm sie aber mit der Zeit an Intensität wieder zu.

Zum Schluss möchte ich noch bemerken, dass man die Anwesenheit des Rhodans beachten muss, wenn man Untersuchungen über Alkaloidausscheidungen durch die Magenschleimhaut ausführt, denn Rhodan beeinflusst gewisse Alkaloidreactionen (Eisenchlorid, Jodsäure).

Ein länger fortgesetzter Gebrauch des Uffelmann'schen Reagens brachte es mit sich, dass ich die Fehlerquellen desselben kennen lernte. In den Büchern sind folgende Fehlerquellen angegeben:

1. Phosphorsäure. Sie gibt mit Eisen eine weissliche Fällung, entzieht demnach dem Reagens einen mehr oder weniger grossen Theil des wirksamen Stoffes und beeinträchtigt durch die Trübung die charakteristische Färbung.

2. Salzsäure, welche im freien Zustand die Reaction beeinträchtigt oder aufhebt.

3. Fette Säuren, Ameisen-, Essigsäure, Buttersäure, Capronsäure, welche mit Eisen eine rothbraune Färbung resp. Fällung geben. In seltenen Fällen mag noch Diacet-Essigsäure hinzukommen.

4. Alkohol gibt Grünfärbung.

5. Traubenzucker gibt ebenfalls Grünfärbung. Dem Traubenzucker möchte ich einen anderen wichtigen Bestandtheil der Stärkeverdauung die Maltose anfügen, welcher gegen Eisenchlorid das gleiche Verhalten zeigt.

Ferner konnte ich noch zwei andere Stoffe nachweisen:

6. Kohlensäure. Bicarbonate nämlich, die in Mageninhalten mit mangelnder freier Salzsäure vorkommen, geben mit Eisenchlorid eine strohgelbe bis gelbbraune resp. braune Färbung. Dies kann man leicht nachweisen, indem man zu einer fast farblosen Eisenchloridlösung etwas Natronbicarbonat oder Carbonat zusetzt und zwar nur soviel, dass die Lösung noch sauer bleibt oder höchstens neutral ist.

7. Rhodan gibt mit Eisen eine Braunfärbung.

Unter Umständen mag auch Schwefelwasserstoff, dessen nicht allzu seltenes Vorkommen im Mageninhalt von Dr. Boas nachgewiesen wurde, störend wirken können. Störend wirkt auch noch die Eigenfärbung des Mageninhaltes, besonders durch Gallenfarbstoff.

Nun kommen noch einige andere Stoffe hinzu, welche ebenfalls die Milchsäurereaction geben, aber nur mit besonderen Speisen in den Magen gelangen, nämlich: Apfelsäure, Wein-

säure, Citronensäure, Oxalsäure etc. Was diese Körper anbetrifft, so können sie bei richtig angestellter Prüfung auf Milchsäure gar nicht in Betracht kommen. Denn darauf kommt es nicht an, ob der Mageninhalt eine Uffelmann'sche Reaction gibt, sondern ob dieselbe auf grössere Mengen Milchsäure zu beziehen ist. Zu dem Zwecke muss man nach einem geeigneten milchsäurefreien Probefrühstück nach gewissen Zeiten auf gewisse Mengen der Milchsäure fahnden. Diese Principien sind von Herrn Dr. Boas in seiner neuen, oben citirten Arbeit aufgestellt und entwickelt worden. Es genügt hier darauf zu verweisen. Was für die Milchsäure gilt, kann man wohl auch für die Fettsäuren behaupten.

Die Prüfung auf Milchsäure geschieht allermeistens mit dem von Uffelmann angegebenen Eisenchlorid unter Zusatz von Carbolsäure zur Contrastfärbung. Die Anwendung von Carbolsäure habe ich aufgegeben, da dieselbe leicht die Feinheit der Reaction stört, wovon man sich an verdünnter Milchsäurelösung überzeugen kann. Ausserdem muss man eine grössere Menge der blaugefärbten Mischung zusetzen, wodurch der Mageninhalt verdünnt wird. Ich habe es am geeignetsten gefunden, zu etwa 5—10 cbcm. Mageninhalt 1—2 Tropfen einer 5proc. Eisenchloridlösung (Liquor ferri sesquichlorati off. und aqua dest. $\overline{aa}$.) zuzusetzen. Milchsäurelösungen von 1 : 10,000 geben auf diese Art eine deutliche grünliche Färbung — im durchfallenden Licht. Man kann 1 : 10,000 bis 1 : 15,000 als unterste Grenze der Reaction annehmen. Für die quantitative Bestimmung thut man, glaube ich, am besten, eine deutliche Grünfärbung im durchfallenden Licht zu verlangen und danach den Grenzwerth auf 1 : 10,000 zu bestimmen. Zum Vergleich kann man sich ja leicht Lösungen reiner Milchsäure vorräthig halten, welche sich auf Zusatz einiger Körnchen Sublimat ohne Beeinträchtigung der Reaction unverändert halten. Beim Uffelmann'schen Reagens kommt es auf den grünen Farbenton an, nicht auf den gelben, wie man oft angegeben findet. Diese grünliche Färbung kann man bei Vergleichung von Proben leicht hervortreten machen, indem man hinter das Reagensglas ein graues silberfarbenes Papier hält.

Was nun die Fehlerquellen des Reagens anbetrifft, so habe ich erstens mit Dextrose und Maltose Untersuchungen angestellt, in wieweit dieselben zu Täuschungen Veranlassung geben können[1]). 5—10 proc. Lösungen dieser Zuckerarten geben auf die oben angegebene Art mit 1—2 Tropfen 5 proc. Eisenchloridlösung behandelt, eine grünliche Färbung, die mit Milchsäure verwechselt werden kann. Hingegen sind aber 1—2 proc. Lösungen im durchfallenden Licht beinahe farblos und unterscheiden sich deutlich von einer Milchsäurelösung von 1 : 10,000. Man kann also durch 10 fache Verdünnung des Mageninhaltes diese Fehlerquellen beseitigen.

Ferner für den Alkohol kann eine Verfärbung des Reagens von etwa 10 % an angenommen werden, eine Concentration, wie sie nach geeigneten Probefrühstücken im Magen wohl kaum vorkommt.

Gallenfarbstoff nun verhält sich dem Eisenchlorid gegenüber folgendermassen. Eine wässerige Lösung ganz frischer Galle von deutlich hellgrünlicher Farbe nimmt auf Zusatz von Eisenchlorid an Intensität der Grünfärbung nicht zu. Verdünnt man die Lösung soweit, bis sie farblos ist, so erhält man auf Zusatz von Eisenchlorid dementsprechend keine Grünfärbung. Ist also ein gallig gefärbter Mageninhalt bei 10 facher Verdünnung farblos, was meistens der Fall ist, oder nur ganz schwach grünlich verfärbt, und gibt es auf Zusatz von Eisenchlorid eine intensiv hervortretende Grünfärbung, so rührt dieselbe wohl nur von Milchsäure her.

Was nun ferner diejenigen Substanzen anbetrifft, welche die charakteristische Milchsäurefärbung verdecken, nämlich: Phosphorsäure, Salzsäure, Kohlensäure (Rhodan ist durch Sublimat leicht zu beseitigen) und Fettsäuren, so wird auch deren Einfluss durch Verdünnung des Mageninhaltes bedeutend vermindert. Man muss aber nicht, wie es Haas thut, um den Einfluss der freien Salzsäure zu vermindern (Münchener medicinische Wochenschrift 1888, Nr. 6) erst das Reagens zusetzen und dann allmälig verdünnen, sondern erst in be-

---

[1]) Die Zuckerproben sind vorher im Soxhlet-Apparat ausgiebig mit Aether extrahirt worden.

stimmtem Grade verdünnen und dann Eisenchlorid zusetzen. Ich halte es nun für das Geeignetste, die Milchsäureprüfung im Mageninhalt nicht, wie es bisher üblich war, mit dem unverdünnten Mageninhalt, sondern mit dem auf's 10fache verdünnten Mageninhalt unter Zusatz von 1—2 Tropfen 5proc. Eisenchloridlösung pro 10 cbcm. anzustellen. In manchen Fällen sind höhere Verdünnungen wie 1 : 20 noch günstiger. Erhält man auf die angegebene Art mit dem auf's 10- resp. 20fache oder noch weiter verdünnten Mageninhalt eine deutliche Grünfärbung, so weiss man auch, dass 1‰ resp. 2‰ Milchsäure oder mehr darin vorhanden ist. 1‰ kann man auch als Grenzwerth, von wo an die Milchsäurebildung pathologisches Interesse gewinnt, annehmen. Beim Magenkrebs findet man fast immer höhere Werthe.

Die mit dem auf bestimmte Grade verdünnten Mageninhalt angestellte Reaction hat nicht nur den Vortheil, dass man die Milchsäuremenge annähernd quantitativ bestimmen kann, sondern auch den, dass eine positive Reaction von anderen Substanzen nicht mehr vorgetäuscht wird, und dass ein Verdecken der Reaction durch störende Substanzen viel schwerer möglich ist. Von Letzterem konnte ich mich leicht dadurch überzeugen, dass ich bei Mageninhalten, welche im unverdünnten Zustande $^1/_{10000}$ Milchsäure verdeckten, in der 10fachen Verdünnung (nach Zusatz zweier Tropfen 1proc. Milchsäurelösung) $^1/_{10000}$ Milchsäure deutlich nachweisen konnte. Auf diese Weise gewinnt also die Eisenchloridreaction an Zuverlässigkeit und Bedeutung[1]).

Die Fehlerquellen der Milchsäurereaction sind zum Theil insofern von weiterer Bedeutung, als auch der qualitative Nachweis der Essigsäure durch sie beeinflusst wird. Derselbe geschieht jetzt in der Weise, dass der angesäuerte Mageninhalt mit Aether ausgeschüttelt wird. Der Aether wird verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung genau neutralisirt

---

[1]) Mageninhalte, welche stark gallenhaltig oder bluthaltig sind und noch in der 10fachen Verdünnung die Milchsäure verdecken, behandle man mit Barythydrat, Salpetersäure, Zinkoxyd, wie unten angegeben, und verdünne das letzterhaltene Filtrat.

und mit Eisenchlorid versetzt. Die Probe ist ziemlich umständlich und dabei auch ungenau. Essigsäure geht aus wässeriger Lösung nicht leicht in Aether über. Dazu wird auch Rhodanwasserstoffsäure vom Aether mit aufgenommen. Aus der mit Eisenchlorid entstehenden Farbenreaction kann man zudem auch keinen Schluss über die etwa im Mageninhalt enthaltenen Mengen von Fettsäuren machen. Ich versuchte nun auf bequeme Art die Reaction mit dem Mageninhalt selbst anzustellen. Das Verfahren ist folgendes: Man nimmt $^2/_3$—$^4/_5$ Reagensglas voll Mageninhalt, setzt dazu einen Ueberschuss, also eine ordentliche Messerspitze von feingepulvertem Barythydrat und lässt es unter mehrfachem Umschütteln 10—15 Minuten stehen. Die Reaction muss stark alkalisch sein; es schlägt sich Baryumphosphat und -Carbonat nieder. Etwaiger Gallenfarbstoff kann durch Baryumphosphat soweit mit niedergerissen werden, dass die Flüssigkeit vollkommen farblos ist[1]). Bei phosphatarmen Mageninhalten setzt man passend wenige Körnchen Natriumphosphat zu. Die Niederschläge filtrirt man ab. Man bringt nun ein Stück Lakmuspapier in das Filtrat, setzt vorsichtig tropfenweise unter Umschütteln reine concentrirte Salpetersäure bis zur deutlichen Rothfärbung des Lakmuspapieres zu. Man braucht dazu nur wenige Tropfen (für 10 cbcm. Barythydratlösung nur 8—9 Tropfen), sodass die daraus entstehende Verdünnung nicht in Betracht kommt. Man erwärmt nun bis zum Kochen und setzt zum Zweck der Neutralisation eine ordentliche Messerspitze Zincum oxydatum album zu. Man schüttelt kräftig um. Die Neutralisation ist nach der Eigenschaft der Zinksalze dann erreicht, wenn das Lakmuspapier nur so schwach roth gefärbt ist, dass der blaue Farbenton daneben noch sichtbar ist. Man filtrirt nun ab. Das Filtrat ist phosphorsäurefrei, kohlensäurefrei und neutral und hat fast dieselbe Concentration, wie der ursprüngliche Mageninhalt. Man setzt nun 1 resp. 2 Tropfen 5proc. Eisenchloridlösung zu. Durch beigemengte Milchsäure erhält man nun oft zuerst eine grünlich-gelbe Färbung. Fügt man weiter Tropfen für Tropfen

[1]) Dasselbe gilt für Blutfarbstoff.

Eisenchloridlösung unter jedesmaligem Umschütteln zu, so tritt bei Anwesenheit von Fettsäuren oder Rhodan ein brauner Farbenton auf, welcher oft die Milchsäurefärbung ganz verdeckt. Aus der Braunfärbung oder Rothbraunfärbung (höhere Fettsäuren, wie Buttersäure geben auch eine Fällung) im Vergleich zu einer Controlprobe (dieselbe Menge Wasser mit derselben Tropfenzahl Eisenchlorid) kann man die Anwesenheit von Fettsäuren erkennen. Der braune Farbenton tritt deutlich hervor, wenn man direct hinter das Reagensglas ein silbergraues Papier hält. Gibt die Probe eine Braunfärbung, so muss aber hierbei noch entschieden werden, in wieweit die Färbung durch Rhodan beeinflusst ist. Man fügt zu dem Zweck verdünnte Salzsäure tropfenweise hinzu; die von den Fettsäuren herrührende Färbung verschwindet zuerst, danach die grünlich-gelbe der Milchsäure; die rothbraune vom Rhodan bleibt vorhanden; letztere verschwindet auf Zusatz von Sublimat. Auch kann man zur neutralen Lösung zur Beseitigung etwaiger Rhodanfärbung Sublimat zusetzen (etwa 2—3 Tropfen einer 10proc. Lösung)[1]). Ich glaube, dass nach einer solchen Behandlung des Mageninhaltes Braunfärbung resp. Rothbraunfärbung, die nicht von Rhodan herrührt, mit Sicherheit auf fette Säuren bezogen werden kann. Man kann die Probe noch schärfer machen durch Erhöhung der Concentration des Mageninhaltes. Dies ist leicht durch Eindampfen desselben, etwa auf die Hälfte seines Volumens, zu erreichen. (Nach Neutralisation mit Zinkoxyd und vor dem Zusatz von Eisenchlorid)[1]). Fällt die Reaction negativ aus, so kann man daraus entnehmen, dass in Betracht kommende Mengen von Fettsäuren im Mageninhalt nicht vorhanden sind.

In bequemer Weise und mit wenig Mitteln eine Probe auf Fettsäuren anstellen zu können, ist nicht ohne praktische Bedeutung. Die Umständlichkeit der Probe mit Aetherausschüttelung trägt wohl auch die Schuld, dass die Bildung von Fettsäuren im Magen und deren klinische Bedeutung von den Aerzten auffallend wenig untersucht worden ist.

[1]) Stärkere Eiweisstrübungen filtrirt man ab.

Studien über das Südamerikanische Fleischextract und Fleischpepton.

Von

E. Kemmerich.

(Der Redaction zugegangen am 18. August 1893.)

In meiner letzten Studie über Fleischextract (Ueber Glycogengehalt des Südamerikanischen Extractes, Centralblatt f. d. med. Wissensch. 1893, Nr. 12) gelang es mir, sowohl in dem Kemmerich'schen wie Liebig'schen Extracte einen bis dahin unbekannten Glycogengehalt nachzuweisen. Ich fand einen Gehalt von 14—12 Gramm im Kilo des Ersteren und 5—6 Gramm in gleicher Menge des Letzteren.

Das Glycogen oder Leberstärke kommt bekanntlich nur im Thierreiche vor und wird in der Leber und theils auch im Muskel gebildet und als Material der Energieleistung aufgespeichert. Es verwandelt sich leicht unter dem Einflusse von Fermenten in Traubenzucker, der als solcher im menschlichen Körper theils zur Muskelarbeit, theils zur Erzeugung der thierischen Wärme dient. Der Nachweis des Glycogens im Fleischextracte involvirt also schon den Ausschluss von Fermenten bei der Bereitung des Extractes, und in der That lässt sich auch constatiren, dass bei jener hochentwickelten Industrie das Fleisch nur in ganz frischem Zustande verarbeitet und der Process des Eindampfens mit möglichster Beschleunigung zu Ende geführt wird. Es liegt dies schon im eigenen Interesse der Fabrikation.

Nur in ganz frischen, hellen und aromatischen Extractsorten findet sich Glycogen, in alten, schwarzen Extracten, wie sie noch gelegentlich im Handel erscheinen, ist das Glycogen nahezu zersetzt und zerstört. Es kann daher immerhin

der Glycogengehalt des Extractes mit zur Beurtheilung der Güte desselben und vor Allem zur Beurtheilung der Frische desselben und des Rohmaterials «Fleisch» mit beitragen.

Da man in den letzten Jahren gelegentlich darauf hingewiesen hat, dass manchmal in mit Pferdefleisch hergestellter Wurst ein beträchtlicher Glycogengehalt, der dem süsslichen Pferdefleisch eigen, vorkommt, so muss betont werden, dass bei der Erzeugung von Fleischextract bei so renommirten Etablissements wie denjenigen von Kemmerich und Liebig jeder Verdacht einer Verarbeitung von Pferdefleisch völlig ausgeschlossen ist. Nicht ein einziges Pferd kommt in jenen Fabriken zur Schlachtung. Der nachgewiesene Glycogengehalt entspricht aber auch nur einem solchen, wie er im Rindfleische vorkommt. Bis ein $^1/_4$ % Glycogen hat man im frischen Rindfleische nachgewiesen. Dieser Gehalt genügt bereits im Ueberflusse, um denjenigen des Extractes zu ererklären, da dasselbe 30 bis 40 Mal so concentrirt an löslichen Stoffen ist, wie frisches Fleisch. Das Glycogen lässt sich aus dem Extracte unschwer darstellen, wenn man es in wenig Wasser löst, mit 60 % Alkohol im Ueberschuss versetzt und den glycogenhaltigen abfiltrirten Niederschlag, der nebenbei noch Salze, Leim, Eiweiss u. s. w. enthält, nach den Methoden von Külz mit dreiprocentiger Kalilauge behandelt, die Eiweisskörper durch Kaliumquecksilberjodid und Salzsäure entfernt, und mit Alkohol verschiedene Male ausfällt (Hoppe-Seyler, chem. Analyse 1893, § 58).

Fällt man Fleischextractlösungen bei der chemischen Isolirung seiner Bestandtheile zunächst mit Barytwasser, um die Phosphate zu entfernen, so geht bei dieser Behandlung das Glycogen zum grössten Theil schon in den Niederschlag der Erdphosphate und kann auch aus diesem durch Extrahiren mittelst 3 % Kalilauge nach obiger bekannter Methode qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. Seine Lösung gibt bekanntlich mit schwacher, gelber Jodjodkaliumlösung eine tiefbraune Färbung. Auch konnte ich durch Kochen mittelst verdünnter Schwefelsäure Traubenzucker leicht nachweisen.

Eines der wichtigsten Bestandtheile des Fleischextractes ist das Kreatinin und Kreatin. Nach meinen Untersuchungen ist in frischem, guten Extracte, der gewöhnlichen Meinung ganz entgegen, nur wenig oder fast kein Kreatin, wohl aber grosse Mengen von Kreatinin enthalten[1]). Ich fand im Kemmerich'schen Extracte 4,33% Kreatinin, das ich durch Fällung mittelst alkoholischer Chlorzinklösung in neutraler, concentrirter Lösung bestimmte und nach Hoppe-Seyler's Angaben auf reines Kreatinin berechnete. Interessant war es mir, hierbei die Angaben von Johnson (Proced. of the Royal Society 1891, vol. 50, pag. 28) bestätigen zu können, wonach auch in ganz frischem Fleische kein Kreatin, sondern nur, oder wenigstens ganz vorwiegend nur Kreatinin vorkommt. Nach der Original-Arbeit findet sich erst 37 Stunden nach der Schlachtung Kreatin in grösserer Menge, das aus dem Kreatinin durch Bacterien-Einfluss entsteht. Jedenfalls findet man auch im frischen Extracte unter dem Mikroskope, wenn man dasselbe mittelst wenig Wasser oder Glycerin verdünnt, nur die wetzsteinförmigen, charakteristischen Kreatininkrystalle, nicht aber die säulenförmigen, rhombischen Kreatinkrystalle, die sich aus den Kreatininlösungen, wie ja bekannt, bei langem Stehen bilden und absetzen.

Das Kreatinin erscheint in den ersten Auskrystallisirungen in der Wetzsteinform; zuletzt aber, wenn man der Alkohollösung behufs leichterer Ausfällung Aether zusetzt, in ganz verschiedener Art. Man erhält keine harten Krystalle mehr, sondern seidenförmig glänzende, weisse, perlmutterähnliche Plättchen, das sogenannte Kreatinin in Tafelform, dessen Zusammenhang mit dem gewöhnlichen aber noch unaufgeklärt ist. Die chemischen Reactionen sind dieselben. Bei 235° C. beginnen beide Kreatinine sich zu zersetzen, ohne zu schmelzen, bräunen sich allmälig und werden bei 250—260° vollständig schwarz und verkohlen.

Das tafelförmige wie wetzsteinartige erscheint unter dem Mikroskope im polarisirten Lichte in prächtigen Regenbogen-

[1]) Diese Erscheinung bedarf noch der Aufklärung, da ich andererseits bei früheren Untersuchungen über Pferdefleisch — wie dies ja auch bekannt ist — fast nur Kreatin erhielt.

farben auf dunklem Grunde und gehört also nicht dem regulären Krystallsystem an.

Beide Kreatinine schmecken bitter und sind leicht in Wasser löslich; löslich auch, aber schwer, in 80% Alkohol.

Die qualitative Untersuchung der Niederschläge, die man erhält, wenn man Extractlösungen, die man mittelst Barytwasser von Phosphaten befreit, successive mit neutralem Bleiacetat ausfällt, ergab folgendes Resultat:

Neutr. Bleiacetat-Niederschlag.

Reactionen:

auf Glycogen negativ,
» Zucker »
» Eiweiss mit Millon positiv,
» Biuretreaction zunächst negativ in Folge Verdeckung durch Farbstoffe.

Der Niederschlag enthält neben Chlorblei eiweissartige Körper. Wurde der durch SH_2 entbleite Rückstand im Dialysator dialysirt, so gab der Dialysationsrückstand die Millon'sche Reaction nun besonders schön, da die theilweise diffundirten gelben Farbstoffe die Millons'che Reaction stark verdecken. Es war also Eiweiss vorhanden, nicht Leim, da Gelatinlösungen keine Fällung mit Millon und nur schwache Farbenreaction geben. Der entbleite und in Wasser gelöste Rückstand gab in der Kälte schon mit Essigsäure und Ferrocyankalium schwache Trübung, aber beim Erwärmen starken flockigen Niederschlag von Albumosen.

Die Biuret-Reaction trat ebenfalls prächtig ein, wenn man erst die Eiweisskörper mit kryst. Ammoniumsulfat fällt und die Reaction danach mit nahezu reiner Albumose anstellt. Schlecht gelingt die Reaction mit der gelben Flüssigkeit ohne vorheriges Aussalzen der Albumosen. Der Niederschlag von neutralem Bleiacetat enthält also an Eiweisskörpern **nur Albumosen.** Peptonreactionen fehlen.

Basisch essigs. Bleioxyd (Bleiessig) erzeugt in der klaren, durch Bleiacetat bereits ausgefällten Flüssigkeit einen voluminösen, weissen Niederschlag, der nach Weidel (Annal. d. Ph. u. Ch. 1871) das von ihm entdeckte Carnin, viele noch unbekannte andere Körper und auch Eiweisskörper enthält.

Das noch wenig bekannte Carnin ist eine in Prismen besonders als salzsaure Verbindung schön krystallisirende stickstoffhaltige Base, deren physiologische Wirkungen noch so gut wie unbekannt sind. Das Extract soll nach Weidel 1% davon enthalten. Es lässt sich durch kochendes Wasser dem Bleiessigniederschlag als basische Bleioxydverbindung entziehen und nach bekannten Methoden entbleien und rein darstellen. Ich erhielt weniger als $^1/_4$ % Carnin und scheint es demnach in sehr wechselnder Menge vorzukommen oder selbst in ganz frischem Extract nur in sehr geringer Menge enthalten zu sein.

Der in siedendem Wasser ungelöst gebliebene Theil des Bleiniederschlages enthält nach Weidel:

«den Inosit, kleine Mengen von Milchsäure, etwas Bernstein- «säure, die bisher noch nicht gefunden war, und haupt- «sächlich eine extractartige Substanz, wovon ein «Theil sich in Alkohol löst, der andere unlöslich ist. Ich «(Weidel) habe vergeblich versucht, sie in reine Präparate «zu verwandeln, auch besonders aus ihnen Inosinsäure zu «gewinnen.»

Die von den Bleiniederschlägen verbleibende braune syrupöse Mutterlauge der Extracte gibt **folgende Reactionen:**

Mit verdünnter Schwefelsäure und Wasser gekocht, Fehling's Zucker-Probe ganz negativ, kryst. Ammoniumsulfat negativ, fällt in den Lösungen der **Mutterlauge** nichts aus; also **keine Albumosen vorhanden.**

Phosphorwolframsäure und Salzsäure, starker weisser käsiger Niederschlag, also Pepton (Kühne).

Quecksilberjodidjodkalium starker Niederschlag, Pepton.

Tanninlösung, starker Niederschlag, Pepton.

Ferrocyankalium und Essigsäure negativ; keine Albumosen.

Jodjodkalium negativ, kein Glycogen.

Die Fleischextractmutterlaugen sind also frei von Albumosen, enthalten aber **viel Pepton** (Kühne).

Eine der interessantesten Aufgaben schien es mir nun zu sein, nachdem wir gesehen haben, dass im Fleischextracte Albumosen und Peptone vorkommen, deren Mengen zu bestimmen, um sich eine Vorstellung zu machen, woraus eigentlich Fleischextract in seiner Hauptmasse besteht. Bilden die krystallisirbaren Extractivstoffe des Extractes und seine stick-

stoffhaltigen Basen die Hauptmasse? oder Eiweisskörper? oder sind endlich noch dextrinartige, gummiartige Körper, also Kohlehydrate, in grösserer Menge vorhanden? Diese Frage ist berechtigt, denn man darf nicht vergessen, dass vor nicht langen Jahren Kühne in seinem Lehrbuche den Ausspruch that, dass nahezu 75 % des Extractes von Muskelfleisch unbekannte Stoffe seien.

Alle von mir unternommenen Versuche, im Extracte nennenswerthe Mengen von Dextrin, Maltose oder andere sich beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure in Zucker verwandelnde Kohlehydrate als Glycogen nachzuweisen, fielen total negativ aus. Sechsstündiges Kochen mit 3 % Schwefelsäure am Rückflusskühler, Ausfällen der Eiweisskörper mit Alcohol. absolut Filtration, Eindampfen, zweites Aufnehmen mit Alkohol und Titrirung mit Fehling'scher Lösung ergaben schliesslich einen deutlichen Zuckergehalt von 0,3 bis 0,5 %, welcher aber offenbar dem Glycogen des Extractes entspricht. Würde das Extract Dextrin oder Maltose enthalten, so müsste eine bedeutendere Entfärbung der Fehling-schen Lösung eintreten. Das Kupferoxydul bleibt wegen des hohen Kreatiningehaltes in Lösung. Das Glycogen erklärt also mehr wie zur Genüge den durch Inversion nachweisbaren Zucker. Die braune Farbe des Fleischextractes beruht auch zum Theil auf caramelirtem Zucker, da das Glycogen unter Einfluss von Milchsäure und sauren Phosphaten sich allmälig beim Kochen in Zucker verwandelt, welcher zu dem eigenthümlichen aromatischen Geschmack des Extractes eine gewisse Beziehung hat. Die Inversion des Glycogens in Zucker geht aber lange nicht so schnell vor sich, als man gewöhnlich annimmt, denn sonst wäre im Extracte, welches doch mindestens zwei Tage zur Eindampfung erfordert, bei der stark sauren Reaction der Lösung überhaupt kein Glycogen mehr vorhanden.

Quantitative Bestimmung der Eiweisskörper des Fleisch-Extractes.

5,165 gr. Extract in 100 cbcm. Wasser gelöst mit kryst. Ammoniumsulfat in der Siedehitze ausgefällt, filtrirt, die

Albumosen mit Barytcarbonat und Wasser gekocht, so lange noch Ammoniak entweicht, endlich etwas Barytwasser zugesetzt, im Wasserbade eingedampft, den überschüssigen Baryt mit verdünnter Schwefelsäure entfernt, filtrirt, eingedampft, ergab: 9,89 % Albumosen.

Die Ammoniumsulfatlösung gab auch bei abwechselnder alkalischer und saurer Reaction (Kühne) keine Fällung mehr, war also vollständig ausgesalzen und frei von Albumosen.

Zur Bestimmung des Peptons (nach Kühne) wurde eine gesonderte Probe von 10 gr. mit 80 % Alkohol ausgezogen, wobei Gelatine und Albumosen ungelöst blieben, Pepton aber in Lösung geht und neben Kreatinin durch Phosphorwolframsäure und verdünnte Schwefelsäure gefällt wird. Das nach Kühne (siehe Hoppe-Seyler's Lehrbuch) rein dargestellte Pepton und Kreatinin ergab 16,74 und nach Abzug von 4,33 % für Kreatinin, das in einer besonderen Probe durch alkoholische Chlorzinklösung gefällt wurde, 12,31 % Pepton. Durch besondere Versuche stellte ich fest, dass die hier in Betracht kommenden Eiweisskörper sich zu Alkohol in verschiedener Stärke etwa wie folgt verhalten:

Gelatine wird gefällt durch Alkohol von 50—60 % Vol.

Albumosen werden vollständig gelöst von 60 % Alkohol, wenn sie beim Trocknen nicht erhitzt wurden (auf 110—120° C.), alsdann ist die Löslichkeit aufgehoben. Gefällt werden sie aber von 80 % Alkohol.

Pepton (Kühne) ist löslich in 80 % Alkohol und nur durch stärksten über 90 procentigen gut fällbar.

In der Wärme finden die Lösungen wesentlich leichter statt.

Diese Trennung obiger Eiweisskörper ist leider keine sehr scharfe und chemisch ganz exacte, wir können uns ihrer aber praktisch mit Vortheil bedienen, um einen guten Einblick in die im Handel vorkommenden Fleischextracte zu erhalten. Bei Extract mit der zehnfachen Menge 50 % Alkohol behandelt, gingen 84,91 % in Lösung, 15,09 % blieben ungelöst, die zu 8,90 % aus Asche (hauptsächlich Erdphosphaten) und zu 6,19 % aus Gelatine bestanden, das gemessene Filtrat durch berechneten Zusatz von Alcohol. absol. auf

80 % Vol. gebracht, ergab nun 17,90 % eines neuen Niederschlags, von welchem

3,14 % auf Asche (haupts. Phosphate),
und 14,76 » auf Albumosen

kommen.

Der in 80 % lösliche (55,12 %) Theil enthält noch 10,25 % Asche, hauptsächlich Chlorkalium und Kaliphosphat, nebst 44,87 % organischen Substanzen = 12,31 % Pepton und 32,56 % Extractivstoffe des Fleisches.

Bemerkungen zu der jetzt gebräuchlichen Methode der Analyse des Fleischextractes.

Nach der seiner Zeit von Justus von Liebig angegebenen Methode, das Fleischextract des Handels zu analysiren, werden 2—3 gr. in 9 cbcm. Wasser gelöst, 50 cbcm. 93 proc. Alkol zugesetzt, in Ruhe einige Stunden stehen gelassen, filtrirt und der Rückstand zum zweiten Male mit 50 cbcm. aber 80 proc. Alkohol ausgezogen, ohne Weiteres auszuwaschen. Das Filtrat wird im Wasserbade verdampft und bei 100° C. 6 Stunden oder bis zur Gewichtsconstanz getrocknet. Ebensoviel Extract wird im Porzellan- oder Platintiegel verascht und schwach geglüht.

Die Wasserbestimmung geschieht mit gleichfalls 2—3 gr. Extract, das im Trockenschrank bei 100° C. 24 Stunden oder bis zur Gewichtsconstanz getrocknet wird.

Man erhält so von guten Extracten des Handels annähernd im Mittel von mehreren Hundert Analysen, die ich ausführte,

14—18 % Wasser,
20—22 % Asche,
58—64 % in 80 % Alkohol lösliche sog. Extractivstoffe des Fleisches.

Zu der Wasserbestimmung ist nichts zu bemerken.

Zu der Aschenbestimmung hingegen, dass, wenn man nach der genauen Angabe in der Muffel verascht, oder auch nur stark im Tiegel glüht, eine nicht unbedeutende Menge

des Chlormetalls (Chlorkalium) verliert, das sich verflüchtigt. Man glüht besser ganz schwach, befeuchtet den erkalteten, schwarzen Rückstand mit Wasser und glüht nach vorsichtigem Trocknen von Neuem. Die nun oben aufliegende Kohle verbrennt dann allmälig, und es bleibt weisse oder etwas graue Asche.

Die Alkohol-Extraction (mit 93proc. Alkohol nach vorheriger Lösung in 9 cbcm. Wasser) gibt nach Zurechnung des Wassergehalts des Extracts eine nur 75—78procentige Alkohollösung, anstatt 80proc., also eine etwas zu schwache, besonders wenn man mehr Extract, der ja wasserhaltig ist, in Arbeit nimmt. Es scheiden sich daher bei dem nachherigen Zufügen von 50 cbcm. 80proc. Alkohol schon einige Eiweisskörper resp. Salze als Trübung aus. Man sollte 82—85proc. nehmen und den Wassergehalt des Extracts berücksichtigen. Ich erhielt so bei der alten Methode, ohne Rücksicht auf den Wassergehalt des Extractes, 4 °/₀ höhere Werthe, als wenn ich ganz streng mit 80proc. vol. Alkohol arbeitete oder das vorher entwässerte Extract mit Sand zerrieb und genau mit 100 cbcm. 80proc. extrahirte. Dies gab stets 3—4 °/₀ niedrigere Werthe.

Nichtsdestoweniger halte ich die alte Liebig'sche Methode als eine in der Praxis gut brauchbare, weil sie eine schnell orientirende Methode ist, nur darf man nicht vergessen, dass der 80proc. Alkohol ausser den Extractivstoffen des Fleisches auch Salze und Peptone in Lösung aufnimmt.

Die circa 58—64 °/₀, die in 80proc. Alkohol löslich sind, bestehen demnach aus etwa:

10—12 °/₀ Salzen,
10—12 » Peptonen,
35 » Extractivstoffen.

Hingegen verblieben in dem in 80proc. Alkohol Unlöslichen:

6 °/₀ Gelatine,
10 » Albumosen,
8 » Salze, Erdphosphate,
1 » Glycogen
und 15—18 » kommen auf Wasser.

Es enthält demnach das Fleischextract:

15—18 % Wasser,		
	6,19 %	Gelatine, fällbar durch 50 proc. Alkohol.
14.16 % Albumosen.	9,89 »	Albumosen, } dgl. durch 80 proc. Alkohol,
	4,87 »	andere lösl. Eiweissstoffe, } dgl. durch 80 proc. Alkohol,
	12,31 »	Pepton löslich in 80 proc. Alkohol.
33,23 % Eiweisskörper,		
	20—22,34 %	Asche,
	1,22 »	Glycogen,
	4,33 »	Kreatinin,
	0,25—1,0 »	Carnin,
	1,— »	Fett,
	18—22,09 »	Extractivstoffe, grösstentheils unbekannt.
	0,91 »	Ammoniak, an Phosphorsäure gebunden, nach Schoesing bestimmt.
ca. 51,77 %,		
100,00 % mit 8,13 Stickstoff nach Kjeldahl.		

Nach unseren Untersuchungen besteht also das Fleischextract zu $^1/_3$ aus Eiweisskörpern, die reichlich die Hälfte, oder fast $^2/_3$ der festen organischen Bestandtheile bilden. Nach der alten Lehre Liebig's soll das Fleischextract frei von Eiweiss sein. Diese Auffassung muss also rectificirt werden, indem das Extract allerdings frei von gerinnbarem Eiweiss ist, aber 33 % lösliche, grössentheils Albumosen und peptonartige Eiweisskörper enthält. Ist das Extract demnach nur als einfaches Reiz- oder Genussmittel anzusehen? Dagegen spricht sein hoher Gehalt von löslichem Eiweiss, dafür die geringe Menge des Stoffes, die gewöhnlich zur Verwendung zur Nahrung kommt.

Wie verhält sich nun das Fleischextract gegenüber den Fleischpeptonen?

Ein Blick auf die chemische Zusammensetzung beider Präparate — nehmen wir das Kemmerich'sche Fleischextract und Fleischpepton — ergibt, dass beide Präparate nahezu dieselben Körper enthalten, aber in verschiedener Menge. Das Fleischextract enthält mehr Salze und Extractivstoffe, das Fleischpepton aber nahezu doppelt so grosse Mengen an löslichen Eiweisskörpern. Ersteres kann

man daher besser, da es nur in kleinen Mengen genossen wird, in der Reihe der Genussmittel belassen, letzteres ist aber vermöge seines hohen Albumosengehaltes und weil es gewöhnlich in doppelt so hoher Menge als Extract genossen wird, entschieden ein Ernährungsmittel, dass durch die natürliche Beimischung der Nährsalze und aromatischen Extractivstoffe des Fleisches ganz besonders zur Ernährung schwacher und kranker Menschen geeignet ist.

Die beiderseitigen Analysen ergeben gegenübergestellt:

Kemmerich's Fleischextract.	Kemmerich's Fleischpepton nach J. König.
6,19 % Gelatine,	18,75 % lösl. Eiweiss und Leim,
9,89 » Albumosen,	39,16 » Albumosen und Peptone.
4,87 » andere lösl. Eiweisskörper,	
12,31 » Pepton.	
33,26 % Eiweisskörper.	57,91 % Eiweisskörper.

Zu bemerken ist, dass sich obige Werthe auf Extract von nur 14,79 % Wassergehalt beziehen, demnach also bei durchschnittlich 18 % Wassergehalt etwas niedriger ausfallen dürften, während sich die Pepton-Analysen auf Producte von 30 und 34 % Wasser beziehen und für gewöhnlich bei 30 % Wasser demnach etwas höher ausfallen dürften. Man darf als richtiges Mittel annehmen, dass Extract 30 % und Fleischpepton 55—58 % lösliche Eiweisskörper enthalten.

Dialysation von Extract und Pepton.

Es ist den Chemikern bekannt, welche grosse Schwierigkeiten bei den Fleischextract-Untersuchungen der einzelnen Stoffe dadurch aufstossen, dass sämmtliche bekannten krystallisirbaren Verbindungen, besonders aber die stickstoffhaltigen Basen und Extractivstoffe mit einer Beimischung von klebrigen, gummiartigen, dunklen Stoffen behaftet sind, welche die Isolirung der Ersteren ausserordentlich erschweren. Ich habe daher den Versuch gemacht, das Fleischextract durch Dialysation in krystallisirbare und umkrystallisirbare Körpergruppen zu trennen. In langen, U-förmig gebogenen Pergamentschläuchen setzte ich ein Kilo Extract in dem dreifachen

Wassergewicht gelöst nun einer sechsfachen Wassermenge aus, die 5 Tage lang täglich erneuert und sofort im Wasserbade eingedampft wurde. Da es Winter war, bedurfte es keines Thymol-Zusatzes, um Gährungsvorgänge zu verhindern. Es resultirten nun den 5 einzelnen Tagen entsprechende gelbe, nicht mehr braune, krystallisirbare Massen. Gegenüber diesen waren die in den Schläuchen verbleibenden Lösungen dunkelbraun. Sie wurden gleichfalls eingedampft und ergaben nun ein entsalztes und nicht mehr aromatisch schmeckendes Extract, das keine Spur von Krystallisationsvermögen mehr zeigte, sondern durch die Colloidstoffe klebrig, gummiartig erschien. Man kann also, wie man sieht, das Extract recht gut durch Dialyse in zwei Gruppen trennen, die auch dem Gewichte nach ziemlich den Hälften entsprachen. Die diffundirten Lösungen enthalten nahezu alle oder doch die meisten Salze, Kreatinin, Inosinsäure, Inosit und die zahlreichen stickstoffreichen Basen, während in den Pergamentpapierschläuchen ein Dialysationsrückstand verbleibt, der nebst wenigen Salzen aus Colloidsubstanzen, Albumosen-Pepton und etwas Leim besteht. Merkwürdigerweise lassen sich nicht alle Salze durch Diffusion entziehen, sondern etwa ein Drittel bleibt (besonders Erdphosphate und Kaliphosphate mit den Albumosen und anderen Eiweisskörpern verbunden) zurück und müssen daher wohl in chemischen Verbindungen mit denselben existiren.

Die Analyse des Dialysationsrückstandes des Extractes ergibt bei 20,85 % Wassergehalt:

	17,82 %	Albumosen	gsg.	9,89 %,	in gewöhnl. Extract.
	15,85 »	Pepton	»	12,31 »	
9,10 %	2,84 »	in Wasser lösl. Asche	»	21,— »	
	6,26 »	» » unlösl. »			

9,52 % Stickstoffgehalt nach Kjeldahl gsg. 8,13 % im gewöhnl. Extract.

Berücksichtigt man aber, dass das untersuchte gewöhnliche Extract nur 14,65 % Wasser enthielt (anstatt 18—20). so ergibt sich der Stickstoff-, Albumosen-, Pepton- und Aschengehalt des Extractes wesentlich höher (etwa um 5 %), als der des Dialysationsrückstandes angegebene. In einer wasser-

und aschefreien Dialysationsrückstandprobe berechnet sich der Stickstoffgehalt sogar auf 14 %. Die Untersuchung der diffundirten, krystallisirten Körper, besonders derjenigen, die in den ersten Tagen nahezu eiweissfrei die Pergamentwand passiren, wird sicherlich eine dankbare Aufgabe sein, da sie von den die Untersuchung so erschwerenden Eiweisskörpern nahezu frei sind.

Das Kemmerich'sche Fleischpepton lässt sich gleichfalls durch Dialyse in Pergamentschläuchen entsalzen. Die aromatischen und salzigen Stoffe gehen in die äussere salzige Lösung, während in den Schläuchen die entsalzten Albumosen und Peptone zurückbleiben.

Als Resultate unserer Untersuchung können wir nun Folgendes mittheilen:

Entgegen der allgemeinen Ansicht, die auch in den neuesten Werken vertreten ist (so Prof. Dr. Koenig, III. Auflage 1893, die menschliche Nahrung und Genussmittel; ferner Prof. Moeller, Lehrbuch der Arzneimittellehre, Wien 1893), besteht das Fleischextract nicht der Hauptsache nach aus Extractivstoffen des Fleisches mit wenig Pepton, Leim und Eiweisskörpern nebst Dextrin und gummiartigen Stoffen, sondern umgekehrt zu etwa 30 % aus Eiweisskörpern, Albumosen und Pepton; zu 20 % aus sogenannten Nährsalzen, 18 % aus Wasser und 25 % aus Extractivstoffen nebst einigen Procenten Glycogen, Inosit, Fett, Ammoniak und zersetztem Zucker. Das Fleischpepton hingegen, wie es in den Kemmerich'schen Etablissements in Südamerika dargestellt wird, enthält nahezu doppelt so viel Eiweisskörper, Albumosen und Pepton, hingegen halb so viel Salze und Extractivstoffe als wie Extract. Will man also Speisen und Suppen würzen, so ist das Fleischextract, als an aromatischen Stoffen reicher, vorzuziehen; hingegen zum Zwecke der Ernährung, des Ersatzes oder der Ersparniss von Eiweisskörpern ist das Pepton weitaus überlegen und daher in allen Fällen zu bevorzugen, wo man eine leicht stimulirende und leicht absorbirbare stickstoffhaltige Nährsubstanz dem schwachen oder kranken Körper zuführen will.

Es lassen sich die drei Gruppen von Eiweisskörpern, wenn auch nicht chemisch exact, so doch zur praktischen Orientirung, hinreichend genau durch Alkohol von verschiedenen Volumprocenten trennen; indem Leimsubstanzen mit 50procentigem ausgefällt werden, Albumosen mit 80procentigem und die Peptone in Lösung bleiben. Die gleichzeitig mitgefällten Salze müssen durch besondere Aschenbestimmungen bestimmt und von den Eiweisskörpern subtrahirt werden. Sämmtliche sogenannten Extractivstoffe des Fleisches sind in hinreichendem Maasse in 80proc. Alkohol löslich und werden beim Abdampfen mit den Peptonen erhalten.

Durch Dialyse lassen sich die Fleischextracte und Fleischpeptone in zwei Gruppen theilen, indem sämmtliche aromatischen und krystallinischen Extractivstoffe und die meisten Salze in Lösung gehen, während die verhältnissmässig schwerer diffundirbaren Colloidsubstanzen, Leim, Albumosen, Peptone, als dunkle geschmacklose Extracte, von höherem Stickstoffgehalt wie die Gesammtmasse, als Rückstand verbleiben. Es erleichtert diese Trennung für zukünftige Untersuchungen den Einblick in die Gruppenbestimmung der verschiedenen chemischen Körper.

Auch die vorstehenden Untersuchungen wurden im chemischen Laboratorium der Landwirthschaftlichen Hochschule zu Berlin ausgeführt und verdanke ich der Güte des Herrn Prof. Dr. M. Fleischer die Benutzung des genannten Laboratoriums.

Zur Kenntniss des Adenins und Hypoxanthins.

Von

Martin Krüger.

(III. Mittheilung.)

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 7. September 1893.)

Am Schlusse der letzten Mittheilung[1]) über Adenin wurde gesagt, dass zur Gewinnung weiterer Aufschlüsse über die Constitution des Adenins und Hypoxanthins es versucht werden sollte, Alkylderivate der genannten Basen darzustellen und dieselben der Einwirkung von conc. Salzsäure bei höherer Temperatur und der Oxydation mit Salzsäure und chlorsaurem Kali zu unterwerfen, d. h. der Wirkung derjenigen Reagentien auszusetzen, welche beim Bromadenin[2]) mit gutem Erfolge angewendet worden sind.

Bei der Kostspieligkeit des Ausgangsmaterials, des Adenins, war es von wesentlicher Bedeutung, ein Alkylderivat zu finden, welches in möglichst grosser Ausbeute erhalten werden konnte. In dieser Richtung wurden zunächst eine Reihe von Versuchen ausgeführt, welche im Folgenden beschrieben werden sollen.

---

[1]) Diese Zeitschr., Bd. 16, S. 339.

[2]) L. c. und diese Zeitschr., Bd. 16, S. 150.

Alkylderivate des Adenins und Hypoxanthins.

1. Monobenzyladenin.

Das Monobenzyladenin, das einzige bisher bekannte Alkylderivat des Adenins, wurde im hiesigen Laboratorium von G. Thoiss[1]) durch halbstündiges Erhitzen von Adenin mit Benzylchlorid bis zum Siedepunkt des letzteren erhalten: durch Einwirkung von Kaliumnitrit bei Gegenwart von Schwefelsäure geht es in Benzylhypoxanthin über.

Die bequeme Darstellungsweise dieses Körpers liess es wünschenswerth erscheinen, denselben in grösserer Menge für Spaltungs- und Oxydationsversuche darzustellen. Die Versuche von Thoiss wurden daher in etwas veränderter Form wiederholt.

3 gr. Adenin wurden mit 10 gr. Benzylchlorid in einem Kölbchen im Schwefelsäurebade bis zum lebhaften Sieden des Benzylchlorides erhitzt. Beim Erwärmen der Flüssigkeit ist darauf zu achten, dass nur der Boden des Kölbchens die Schwefelsäure berührt, anderenfalls tritt starke Bräunung des Reactionsgemisches ein. Schon nach kurzer Zeit findet die Umsetzung statt, und das ganze Gemisch erstarrt zu einem Krystallbrei, welcher mit Aether zur Entfernung des überschüssigen Benzylchlorids mehrmals digerirt wurde. Der trockene, 7,34 gr. betragende Rückstand bestand im Wesentlichen aus dem Monobenzyladenin-Chlorhydrat neben wenig Dibenzyladenin-Chlorhydrat. Die Entstehung des Dibenzyladenins bei der obigen Reaction war Thoiss entgangen, da er das Product nach Behandlung mit Aether noch mit Alkohol, in welchem das Dibenzyladenin-Chlorhydrat leicht löslich ist, behandelt und diese Lösung nicht näher untersucht hatte.

Zur Trennung des Mono- vom Dibenzyladenin wurde das Gemenge ihrer Chlorhydrate mit heissem Wasser digerirt, durch Ammoniak die freien Basen abgeschieden. Nach dem Erkalten wurde filtrirt, und der Rückstand zunächst mit kaltem Wasser, dann mit kaltem Alkohol so lange ausge-

---

[1]) Diese Zeitschr., Bd. 13, S. 395.

waschen, bis ein Theil des Filtrates durch Wasser nicht mehr getrübt wurde. Die alkoholische Lösung enthält das Dibenzyladenin (s. unten); der Rückstand ist reines Monobenzyladenin, welches nach dem Umkrystallisiren aus Wasser oder Alkohol in schönen Prismen mit den von Thoiss angegebenen Eigenschaften erhalten wird.

Analyse der nicht umkrystallisirten Verbindung:

0,1941 gr. wurden nach der Kjeldahl'schen Methode zerstört; zur Neutralisation des überdestillirten Ammoniaks wurden 42,85 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure verbraucht.

Berechnet für $C_5H_4(C_7H_7)N_5$:	Gefunden:
31,11 % N.	30,91 % N.

Eine 2. Darstellungsmethode für Monobenzyladenin ist die folgende:

5 gr. Adenin werden mit 21 cbcm. 10proc. Kalilauge und 100 cbcm. Alkohol in Lösung gebracht und auf Zusatz von 5 gr. Benzylchlorid 1 Stunde am Rückflusskühler erwärmt. Nach Neutralisation der Lösung wird dieselbe bis auf ein geringes Volumen eingedampft. Der beim Eindampfen und Erkalten der Flüssigkeit entstandene Niederschlag wird mit kaltem Wasser, dann mit Alkohol ausgewaschen. Er stellt gleichfalls reines Monobenzyladenin dar. Ausbeute aus 5 gr. Adenin beträgt 4,5—4,9 gr.

0,2050 gr. verbrauchten 45,6 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure = 31,14 % (verl. 31,11 % N).

Das Monobenzyladenin krystallisirt namentlich aus Alkohol in kurzen, glänzenden Prismen, häufig auch in kleinen, zu tafelförmigen Aggregaten vereinigten, spitzigen Krystallen. Es löst sich in heissem Alkohol leicht, in Aether wenig. Seine Löslichkeit in Wasser von 15° ist 1 : 2250, in Wasser von 100° 1 : 320.

Beim Kochen mit Permanganatlösungen ist es, wie Adenin selbst, sehr beständig. Bei der Oxydation mit Schwefelsäure und Chromsäure wurde ein Theil des Ausgangsmaterials unverändert wiedererhalten, der Rest war zweifellos vollständig oxydirt; denn es gelang nicht, ein Spaltungsproduct zu iso-

liren, welches über die Constitution des Adenins irgend welchen Aufschluss hätte geben können.

Reactionen des Monobenzyladenins: Eine 10proc. alkoholische Lösung desselben gibt:

1. Mit Silbernitrat einen starken flockigen Niederschlag. der schon in der Kälte in Salpetersäure leicht löslich ist;

2. mit ammoniakalischer Silberlösung einen flockig-gelatinösen Niederschlag:

3. mit Quecksilberchlorid einen weissen, flockigen Niederschlag;

4. Pikrinsäure erzeugt einen Niederschlag, der selbst in heissem Wasser sehr schwer löslich ist: aus Wasser umkrystallisirt bildet er haarfeine, verfilzte Nadeln.

5. Goldchlorid erzeugt keinen Niederschlag.

6. Auf Zusatz von Salzsäure und Platinchlorid erscheinen nach längerer Zeit in geringer Menge hellgelbe Flocken.

Das salzsaure Salz krystallisirt in vierseitigen glasglänzenden Prismen mit schiefen Endflächen:

0,179 gr. gaben nach Carius 0,0959 gr. AgCl.
0,3038 » nach Kjeldahl verbrauchten 57,9 cbcm. 1/10 N-Oxalsäure.
0,1837 » » » » 35 » » »

Berechnet für $C_5H_4(C_7H_7)N_5HCl$:	Gefunden:
13,58 % Cl	13,25 % Cl
26,77 % N	26.68; 26,67 % N.

Das schwefelsaure Monobenzyladenin krystallisirt in glasglänzenden, langen Prismen mit 5 Mol. Wasser, von denen 4 Mol. leicht bei 100°, das 5. erst bei 110° abgegeben wird.

0,2062 gr., nach Kjeldahl zerstört, verbrauchten 38 cbcm. 1/10 N-Oxalsäure.
0,3400 gr. gaben 0,1466 $BaSO_4$.
0,3874 gr. verloren bei 100° 0,0422 gr. = 10,89 %; bei 110° 0,0528 gr. = 13,63 % H_2O.

Berechnet für $[C_5H_4(C_7H_7)N_5]_2 . H_2SO_4$:	Gefunden:
25,55 % N	25,80 % N
17,88 % H_2SO_4	18,12 % H_2SO_4.

Brom wirkt auf trockenes Monobenzyladenin in heftiger Reaction ein. Lässt man es neben Brom unter einem Exsiccator stehen, so resultirt innerhalb 12 Stunden eine dunkelrothe zähe Masse, welche bei 120° nur allmälig einen Theil des Broms abgibt und eine dunkelgelbe Farbe und etwas festere Consistenz annimmt. Die Zunahme an Brom entsprach 4 Atomen Brom auf 1 Mol. Monobenzyladenin.

Aus 1,0458 gr. Monobenzyladenin wurden 2,505 gr. Bromderivat erhalten.

2. Dibenzyladenin.

Das Dibenzyladenin wird in Form seines Chlorhydrates in geringer Menge bei directer Einwirkung von Benzylchlorid auf Adenin (siehe oben) erhalten. In besserer Ausbeute wird es gewonnen, wenn man Monobenzyladenin mit Benzylchlorid behandelt, oder wenn man Benzylchlorid auf eine alkoholische Lösung von Adenin bei Gegenwart von Aetzkali einwirken lässt.

Um es auf erstere Weise herzustellen, erhitzt man Monobenzyladenin mit etwa der 4 fachen Menge von Benzylchlorid bis zum Sieden des letzteren. Das Monobenzyladenin scheint in Lösung zu gehen, an dessen Stelle ercheint ein schwach bräunlich gefärbtes Oel am Boden des Kolbens, bedeckt vom Benzylchlorid. Man lässt letzteres noch etwa eine Viertel Stunde unter öfterem Umschütteln der Flüssigkeit einwirken und extrahirt dann das Reactionsproduct, dessen untere Schicht während des Erkaltens erstarrt ist, wiederholt mit Aether. Der in Aether unlösliche, noch schmierige Theil wird mit salzsäurehaltigem Alkohol übergossen, in welchem er zu einem Krystallbrei erstarrt, und das Dibenzyladenin-Chlorhydrat durch Zusatz von Aether vollständig gefällt. Der mit Aether vollständig ausgewaschene Niederschlag wird durch Umkrystallisiren aus wässerigem, mit Salzsäure versetztem Alkohol gereinigt. Das Chlorhydrat krystallisirt in feinen seideglänzenden Nadeln, häufig auch in langen, dem Caffeïn ausserordentlich ähnlichen Prismen mit prachtvollem Seidenglanz.

Es löst sich in Wasser und Alkohol leicht und ist unlöslich in Aether; aus der wässerigen Lösung wird es durch

Zusatz von Salzsäure zum Theil ausgeschieden. Beim Monobenzyladenin-Chlorhydrat wurde diese Eigenschaft nicht bemerkt. Das salzsaure Dibenzyladenin schmilzt bei 219—220°.

Zur Darstellung des Dibenzyladenins nach dem 2. Verfahren werden 10 gr. Adenin in 200 cbcm. 75 volumprocentigen Alkohol durch 20 gr. Aetzkali in Lösung gebracht und dieselbe nach Hinzufügen von 35 gr. Benzylchlorid eine Stunde am Rückflusskühler erwärmt. Nach Verjagen des Alkohols wird die zurückbleibende gelbe, ölige und zähe Masse mehrmals mit heissem Wasser, welches das Monobenzyladenin neben wenig Dibenzyladenin aufnimmt, ausgekocht. Das in der Kälte, eventuell nach dem Einengen der Flüssigkeiten, sich ausscheidende Monobenzyladenin wird in der oben angegebenen Weise weiter behandelt. — Der in heissem Wasser unlösliche Theil, welcher neben der Hauptmenge des Dibenzyladenins das überschüssige Benzylchlorid enthält, wird durch salzsäurehaltigen Alkohol und Aether zur Krystallisation gebracht und der ausgeschiedene Theil durch Umkrystallisiren aus salzsäurehaltigem wässerigem Alkohol gereinigt.

Analyse des Dibenzyladenin-Chlorhydrates:

0,2289 gr. gaben 0,0939 gr. AgCl = 10,15 % Cl.
0,2174 » » 0,0860 » » = 9,79 % »
0,2413 » verbrauchten 34,4 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.
0,1542 » » 21,75 » » »
0,2258 » gaben 0,5347 gr. CO_2 und 0,1093 gr. H_2O.

Berechnet für $C_5H_3(C_7H_7)_2N_5 . HCl$:	Gefunden:
10,1 % Cl	10,15 %, 9,79 % Cl
19,91 % N	19,96 %, 19,75 % N
64,86 % C	64,58 % C
5,12 % H	5,38 % H.

Die freie Base wird aus dem salzsauren Salz durch Lösen des letzteren in Wasser und Fällen mit Ammoniak dargestellt. Es stellt feine seideglänzende Nadeln dar, welche bei 171° zu einer gelben Flüssigkeit schmelzen. Es löst sich leicht in Aether, sehr leicht in Alkohol. Die Löslichkeit in kaltem Wasser von 13,5° ist 1 : 13,300; in Wasser von 100° 1 : 1300.

0,1686 gr. verbrauchten 26,55 cbcm. 1/10 N-Oxalsäure.

Berechnet für $C_5H_3(C_7H_7)_2N_5$:	Gefunden:
22,22 % N	22,05 % N.

Reactionen des Dibenzyladenins:

1. Eine 1 proc. alkoholische Lösung desselben gibt mit Silbernitrat einen starken, käsigen Niederschlag, der in Salpetersäure schon in der Kälte leicht löslich ist;

2. mit Ammoniak und Silbernitrat einen flockigen und weissen Niederschlag:

3. mit Quecksilberchlorid starken flockigen Niederschlag, der beim Erwärmen sich leicht löst;

4. mit Bleiacetat und bas. Bleiacetat keinen Niederschlag;

5. mit Kupfersulfat flockigen, hellgrünen Niederschlag;

6. mit Salzsäure und Platinchlorid Trübung, aber keine Krystalle;

7. mit Salzsäure und Goldchlorid keinen Niederschlag;

8. mit Pikrinsäure eine in Wasser ausserordentlich schwer lösliche Verbindung.

Salpetersaures Dibenzyladenin: Krystallisirt aus Salpetersäure in feinen, langen und glänzenden Nadeln, welche in verd. Salpetersäure in der Kälte schwer löslich sind. Es schmilzt bei 167° unter Gasentwickelung.

0,1258 gaben 24,35 cbcm. N. bei 768 mm. und 18,4° C.

Berechnet für $C_5H_3(C_7H_7)_2N_5 . HNO_3$:	Gefunden:
22,22 % N	22,54 % N.

3. Monomethyladeninmethyljodid.

Schon Thoiss[1]) hatte versucht, durch Digestion von Adeninsilber mit Methyljodid ein Methyladenin darzustellen. Das von ihm erhaltene als Methyladenin, verunreinigt durch ein Additionsproduct des Adenins, angesehene Derivat ist den unten angegebenen Eigenschaften des Methyladenins nach nicht

[1]) L. l.

Methyladenin, sondern seiner Löslichkeit nach nur ein Additionsproduct gewesen.

Als ich die Silberverbindung des Adenins $C_5H_4AgN_5$ mit der für ein Molecül berechneten Menge Methyljodid bei Gegenwart von Aether einschloss und 6 Stunden auf 110° erwärmte, zeigte sich kaum Gelbfärbung; bei weiterem 13stündigen Erwärmen auf 130° trat ebenfalls nur geringe Umsetzung ein. Die Hauptmenge des Adenins wurde als solches wiedererhalten, daneben eine geringe Menge eines in Alkohol löslichen jodhaltigen Körpers.

Zu besserem Resultate gelangte ich durch Einwirkung von Methyljodid auf Adeninblei.

Adeninblei.

Zur Darstellung des Adeninbleis wurden 10 gr. Adenin in 200 Wasser plus der für 2 Mol. NaOH (auf 1 Mol. Adenin) berechneten Menge 33 % NaOH versetzt, und diese Lösung allmälig in eine wässerige Lösung von 28 gr. Bleiacetat (1 : 1 Mol.) hineingetragen. Der beim Eingiessen der Adeninlösung jedesmal entstehende Niederschlag verschwand zunächst beim Umrühren der Flüssigkeit wieder, bis etwa die Hälfte der ersteren verbraucht war. Alsdann blieb der Niederschlag bestehen und vermehrte sich auf weiteren Zusatz der Adeninlösung.

Das Adeninblei krystallisirt in mikroskopischen, nadelförmigen, glanzlosen Krystallen. Die Analyse der bei 130° getrockneten Verbindung gab Werthe, welche mit den für $C_5H_3N_5Pb$ berechneten nahe übereinstimmten. Die Ausbeute an Adeninblei betrug 94 %—97 % der theoretischen. Die Verbindung hat die Eigenschaft, beim Reiben stark electrisch zu werden.

8 gr. derselben wurden mit 15 gr. Methyljodid 8 Stunden im geschlossenen Rohr auf 100° erwärmt. Der stark gelbgefärbte Röhreninhalt wurde zunächst erwärmt, um das überschüssige Methyljodid zu vertreiben, dann mit heissem Wasser ausgekocht. Das Filtrat wurde durch Schwefelwasserstoff vom Blei befreit, nach Verjagen des ersteren mit Ammoniak schwach

alkalisch gemacht und eingedampft. Der in der Kälte ausfallende Niederschlag wurde aus wenig wässerigem Alkohol umkrystallisirt; es fielen kleine, derbe, glasglänzende Krystalle, welche leicht in Wasser und Alkohol löslich, in Aether unlöslich sind. Die Jod enthaltende Verbindung konnte kein jodwasserstoffsaures Salz sein, da durch Zusatz von Ammoniak nicht die entsprechende freie Base erhalten werden konnte; sie war vielmehr ein Additionsproduct von Methyljodid mit einem substituirten Adenin, und zwar mit Monomethyladenin; sie hat die Formel: $C_5H_4(CH_3)N_5 . CH_3J$.

0,2533 gr. verbrauchten 42 8 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.
0,3038 gr. gaben 0,2444 gr. AgJ.
0,3421 gr. gaben 6,3661 gr. CO_2 und 0,1131 zu H_2O.

Berechnet:	Gefunden:
24,05 % N.	23,65 % N.
43,65 % J.	43,47 % J.
28,87 % C.	29,18 % C.
3,44 % H.	3,67 % H.

Durch Einwirkung von Alkyljodiden auf die Bleiverbindung des Adenins nur Substitutionsproducte des letzteren zu erhalten, war demnach auch hier nicht gelungen. Es wurde noch ein Versuch gemacht, zu einem solchen Product durch Einwirkung von Alkyljodiden auf das von Bruhns[1]) beschriebene Chlorquecksilberadenin zu gelangen. Als jedoch 12,7 gr. dieser Verbindung mit 11 gr. Aethyljodid und 100 cbcm. Alkohol eine Stunde am Rückflusskühler erwärmt wurde, war höchstens eine geringe Umsetzung eingetreten: die Hauptmenge des Adenins wurde wiedererhalten.

Zur Darstellung des Chlorquecksilberadenins wurden 5 gr. Adenin in 500 cbcm. Wasser gelöst und in der Wärme eine Lösung von 10 gr. Quecksilberchlorid (1 : 1 Mol.) in Wasser hinzugethan. Der Niederschlag wurde von der heissen Flüssigkeit abfiltrirt und mit heissem Wasser nachgewaschen. Die Menge desselben betrug nach dem Trocknen bei 120° 6,98 gr. (I. Portion). Als darauf das Filtrat mit Soda bis zur neutralen Reaction versetzt wurde, schied sich wiederum

---

[1]) Diese Zeitschr., Bd. 14, S. 567.

eine grössere Menge derselben Verbindung aus, deren Gewicht 6,5 gr. betrug (II. Portion). Die Analyse beider Theile ergab Werthe, welche mit den für $C_5H_4N_5HgCl$ berechneten gut übereinstimmten. Auf Zusatz von Quecksilberchlorid zu Adeninlösungen wird demnach genau die eine Hälfte desselben ausgefällt, die 2. fällt erst auf Zusatz von Natriumcarbonat.

Die Reaction verläuft nach folgenden Gleichungen:

$$2\,C_5H_5N_5 + 2\,HgCl_2 = C_5H_4N_5.HgCl + C_5H_5N_5.HCl.HgCl_2.$$

$$C_5H_5N_5.HCl.HgCl_2 + Na_2CO_3 = C_5H_4N_5.HgCl + 2\,NaCl + CO_2 + H_2O.$$

4. Diäthylhypoxanthin-Aethyljodid.

Eine Lösung von 1 Mol. Hypoxanthin in 2 Mol. wässeriger Natronlauge wurde allmälig in eine Lösung von 1 Mol. Bleiacetat hineingegossen. Auch hier löste sich der zunächst entstehende Niederschlag von Bleihypoxanthin immer wieder auf und blieb erst auf weiteren Zusatz der Hypoxanthinlösung bestehen. Der Niederschlag ist amorph; die Ausbeute an Hypoxanthinblei betrug 91,5 % der theoretischen.

11 gr. derselben wurden mit 12 gr. Aethyljodid im geschlossenen Rohr auf 100° während 5 Stunden erhitzt. Das stark gelb gefärbte Product wurde mit heissem Wasser ausgekocht, das Filtrat durch Schwefelwasserstoff entbleit und nach Verjagen des letzteren und Neutralisation eingedampft. Der syrupöse Rückstand wurde mit absolutem Alkohol verrieben und durch Aether eine Verbindung gefällt, welche nach Umkrystallisiren aus Alkohol schöne vierseitige, glasglänzende Prismen darstellte. Die Verbindung ist in Wasser und heissem Alkohol leicht löslich, in Aether unlöslich; sie hat die Zusammensetzung: $C_5H_2(C_2H_5)_2N_4O.C_2H_5J$.

0,2850 gr. verbrauchten 32,1 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.
0,263 gr. gaben 0,177 gr. AgJ.
0,2493 gr. gaben 0,3510 gr. CO_2 und 0,1156 gr. H_2O.

Berechnet:	Gefunden:
16,09 % N.	15,77 % N.
36,49 % J.	36,37 % J.
37,93 % C.	38,40 % C.
4,88 % H.	5,15 % H.

Die vorgehend beschriebenen Versuche, Methyl- resp. Aethylgruppen in das Adenin- und das Hypoxanthinmolecül einzuführen, sind insofern resultatlos verlaufen, als es nicht gelungen ist, nur Substitutionsproducte zu erhalten; denn in allen Fällen, wo reine, gut krystallisirende Verbindungen erhalten wurden, waren es Additionsproducte von substituirtem Adenin oder Hypoxanthin. Dennoch sind die Versuche von ziemlicher Wichtigkeit, da sie mannigfache Schlüsse zu ziehen gestatten und für die Anordnung weiterer Alkylirungsversuche nicht zu unterschätzende Fingerzeige geben. Einmal beweist die Existenz des Diäthylhypoxanthinjodids das Vorhandensein zweier durch Alkyle vertretbarer Imidgruppen im Hypoxanthin; ebenso muss auch das Adenin dieselben beiden Gruppen enthalten. Ausserdem enthält das Adenin noch diejenige Imidgruppe, welche beim Uebergang in Hypoxanthin durch ein Atom Sauerstoff ersetzt wird.

Ferner lassen die Versuche einen deutlichen Unterschied in der Substituirbarkeit der beiden Imidgruppen im Adenin und Hypoxanthin erkennen. Während im Hypoxanthin beide Imidgruppen bei 100° ersetzt werden, konnte beim Adenin nur eine Methylgruppe eingeführt werden. Zur Darstellung eines Monoalkylderivates scheint daher das Adenin, zur Darstellung eines Dialkylderivates das Hypoxanthin besser geeignet zu sein.

Die Anlagerung von Alkyljodiden findet bei derselben Temperatur statt, bei welcher die Alkyle substituirt werden. Man könnte dieselbe vielleicht vermeiden oder wenigstens herabsetzen, wenn man die Menge der Alkyljodide bis auf das berechnete Gewicht reducirt. Ausgeschlossen kann eine solche Addition jedoch nur bei einer Alkylirung in Gegenwart von alkoholisckem Kali sein, wie sie bei den Körpern der Harnsäuregruppe zuerst von Schmidt und Pressler[1]) am Theobromin ausgeführt ist.

Die folgenden Versuche haben daher den Zweck, nach dieser Methode das Methyladenin und Dimethylhypoxanthin darzustellen.

---

[1]) Ann. d. Chem. u. Pharm., Bd. 217, S. 294.

5. Monomethyladenin.

5 gr. Adenin wurden in 60 cbcm. Alkohol abs. auf Zusatz von 40 cbcm. Natriumalkoholatlösung (5 gr. Natrium in 100 cbcm. Alkohol) gelöst und nach dem Erkalten der Lösung 10,5 gr. Methyljodid hinzugethan. Diese Mischung blieb mehrere Monate in der Kälte stehen. Der während dieser Zeit entstandene Niederschlag wurde abfiltrirt, in heissem Wasser auf Zusatz von wenig Salzsäure gelöst, die Lösung mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht. Nach 24 Stunden war dieselbe zu langen, feinen seideglänzenden Nadeln erstarrt, welche dem Caffeïn sehr ähnlich sahen. Beim Trocknen an der Luft verschwand der Seidenglanz; das erhaltene Methyladenin war wasserfrei.

0.1146 gr. verbrauchten 34,40 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.

0,1466 gr. gaben 0,2603 gr. CO_2 und 0,0668 gr. H_2O.

Berechnet für $C_5H_4(CH_3)N_5$:	Gefunden:
48,32 % C.	48,42 % C.
4,70 % H.	5,06 % H.
46,98 % N.	46,91 % N.

Die Verbindung schmilzt bei 270° noch nicht.

Bequemer geschieht die Darstellung des Methyladenins, wenn man das Methyljodid auf die Lösung des Adenins in der Wärme einwirken lässt.

Zu dem Zwecke löst man Adenin in alkoholischer Natronlauge, welche die für 1 Molecül berechnete Menge an Aetznatron enthält und erwärmt. Die Mischung wird nach Zusatz von 5,3 gr. Methyljodid (1 : 1 Mol.) eine Stunde am Rückflusskühler erwärmt, man lässt sie darauf erkalten und noch mehrere Stunden stehen. Der abfiltrirte, mit Alkohol gewaschene Niederschlag wird aus heissem Wasser umkrystallisirt; beim Erkalten scheidet sich das Methyladenin in schönen glasglänzenden, prismatischen Krystallen aus; es enthält kein Krystallwasser.

Das alkoholische Filtrat wurde mit dem gleichen Volumen Aether und mit Salzsäure bis zur stark sauren Reaction versetzt. Aus der wässerigen, mit Ammoniak neutralisirten Lösung des Niederschlages schieden sich feine, weisse, nicht glänzende Nadeln aus, welche der Analyse nach gleichfalls Methyladenin, aber $1^1/_2$ Mol. Krystallwasser enthaltend, waren.

Die Analyse dieses Präparates ergab:

0,1087 gr. der lufttrockenen Substanz nahmen bei 100° um 0,0159 gr. ab und verbrauchten 30.7 cbcm $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.

Berechnet für $C_5H_4(CH_3)N_5 + 1^1/_2$ aqua:	Gefunden:
15,34 °/₀ H_2O.	14,62 °/₀ H_2O.
39,77 °/₀ N.	39,54 °/₀ C.

Ob dieses Methyladenin mit den beiden vorher beschriebenen identisch ist, muss dahingestellt bleiben. Es wurde von demselben nur eine geringe Menge erhalten und daher auf die Darstellung desselben bei späteren Versuchen verzichtet.

Die Ausbeute an dem in glasglänzenden Prismen krystallisirenden Präparat betrug 40 °/₀ der theoretischen. Dieses Methyladenin ist zweifellos identisch mit den in langen, seidenglänzenden Nadeln krystallisirenden, welches durch Einwirkung von Methyljodid auf die kalte Lösung des Adenins in alkoholischer Natronlauge erhalten war. Beide verhielten sich allen Reagentien gegenüber vollkommen gleichartig, namentlich zeigten auch die Krystalle ihrer Platin- und Golddoppelsalze dieselbe Löslichkeit und dieselben Gestalten.

Das Golddoppelsalz des Methyladenins krystallisirt in feinen, gelben, nicht glänzenden Nadeln. Es scheidet sich auf Zusatz von Goldchlorid zu einer starken Lösung von Methyladenin in Salzsäure nach längerem Stehen aus.

0,2845 gr. gaben 0,1149 gr. Au.

Berechnet für $C_6H_7N_5 . HCl . AuCl_3$:	Gefunden:
40,34 °/₀ Au.	40,38 °/₀ Au.

Das Platindoppelsalz, welches in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich ist, krystallisirt in glänzenden 6seitigen oder 4seitigen rhombischen Blättchen.

Eine 1proc. Lösung des Methyladenins in Wasser gibt folgende Reactionen:

1. Pikrinsäure erzeugt sofort einen in Wasser sehr schwer löslichen Niederschlag, der in sehr feinen, zu kugeligen Aggregaten vereinigten Nadeln krystallisirt.

2. Silbernitrat ruft einen weissen käsigen Niederschlag hervor, der in kleinen Prismen krystallisirt und in Salpetersäure leicht löslich ist.

3. Mit ammoniakalischer Silberlösung entsteht ein gelatinöser, in Ueberschuss von Ammoniak schwer löslicher Niederschlag.

4. Quecksilberchlorid erzeugt einen starken, weissen, flockigen Niederschlag.

5. Kupfersulfat und Kalilauge bewirken einen hellgrünen voluminösen Niederschlag, der beim Erhitzen der Flüssigkeit unverändert bleibt.

6. Kupfersulfat und Natriumbisulfit oder Natriumthiosulfat erzeugen einen weissen, flockigen Niederschlag, die Kupferoxydulverbindung des Methyladenins. Dieselbe löst sich, ebenso wie die Silberverbindung des Methyladenins, in Natriumthiosulfat leicht auf.

7. Bleiacetat und bas. Bleiacetat erzeugen keinen Niederschlag.

Methyladenin gibt wie Adenin selbst ein Monobromderivat. Uebergiesst man gepulvertes Methyladenin mit trockenem Brom, lässt dasselbe längere Zeit einwirken, verjagt den Ueberschuss und trocknet den Rückstand bei 120°, so entspricht die Zunahme 1 Mol. Brom. Der Rückstand besteht also aus bromwasserstoffsaurem Brommethyladenin. Der Körper wurde nicht weiter untersucht.

6. Dimethylhypoxanthin.

5 gr. Hypoxanthin werden in 50 cbcm. Alkohol durch Zusatz von 46 cbcm. Natriumalkoholatlösung (5 gr. Natrium auf 125 cbcm. Alkohol) und 50 cbcm. Wasser in Lösung gebracht, und die Mischung mit 11 gr. Methyljodid 6—9 Stunden am Rückflusskühler erwärmt. Nach Einleiten von Kohlensäure und Einengen der Flüssigkeit auf dem Wasserbade erstarrt dieselbe zu einem Krystallbrei, welcher aus Alkohol umkrystallisirt in schwach glänzenden prismatischen Krystallen wieder ausfällt. Der Körper ist eine Verbindung von Dimethyl-

hypoxanthin mit Natriumjodid, welche mit 3 Mol. Wasser krystallisirt: $C_5H_2(CH_3)_2N_4O . NaJ + 3$ aqu.

0,2542 gr nahmen bei 110° ab um 0,0375 gr. und verbrauchten 27.4 cbcm. 1/10 N-Oxalsäure.

0,4199 gr. gaben 0,2664 gr. AgJ.

0,4894 gr. hinterliessen nach Zerstören mit Schwefelsäure und Glühen 0,0953 gr. Natriumsulfat.

0,2840 gr. gaben 0,2422 gr. CO_2 und 0.0979 gr. H_2O.

Berechnet für die obige Formel:	Gefunden:
14,67 % H_2O.	14,75 % H_2O.
34,51 % J.	34,29 % J.
15,22 % N.	15,09 % N.
6,25 % Na.	6,31 % Na.
22,83 % C.	23,26 % C.
3,80 % H.	3,83 % H.

Die Ausbeute an dieser Verbindung betrug 3 gr. Die Verbindung ist in Wasser und heissem Alkohol leicht löslich, in Aether unlöslich.

Eine ähnliche Doppelverbindung einer Base mit einer Halogenverbindung von Alkalien ist bisher bei keinem Körper aus der Harnsäuregruppe bekannt geworden. Versuche, derartige Verbindungen beim Caffeïn, welches (siehe unten) dem Dimethylhypoxanthin am meisten ähnlich ist, darzustellen, misslangen. Aus einer wässerigen oder alkoholischen Lösung von Caffeïn, welche längere Zeit mit Natriumjodid erhitzt worden war, krystallisirte immer nur unverändertes Caffeïn aus.

Zur Darstellung der freien Base wurde die eben beschriebene Doppelverbindung des Dimethylhypoxanthins in Wasser gelöst, zur Entfernung des Jods mit frisch gefälltem Silberoxyd behandelt. Das Filtrat wurde darauf mit Kohlensäure gesättigt und zur Trockne eingedampft. Dem Rückstand liess sich durch Chloroform leicht das freie Dimethylhypoxanthin entziehen.

Beim Verdunsten des Chloroforms schied sich die Base in feinen, seideglänzenden Nadeln mit 3 Mol. Krystallwasser aus.

Zur Entfernung des häufig dem chloroformischen Rückstande anhaftenden Farbstoffes behandelt man die Base mit

kaltem Alkohol, welcher den Farbstoff leicht aufnimmt, und krystallisirt sie aus Alkohol um. Sie scheidet sich aus Alkohol in kleinen, zu Drusen vereinigten, spitzigen Krystallen aus, welche kein Krystallwasser enthalten. Die Base ist sehr leicht in Wasser und Chloroform löslich, schwieriger in Alkohol.

Analyse der aus Chloroform erhaltenen Krystalle:

0,1538 gr. nahmen bei 120° ab um 0,037 gr.
0,1168 gr. trockene Substanz 28,5 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.
0,1777 gr. gaben 0,3347 gr. CO_2.

Berechnet für $C_5H_2(CH_3)_2N_4O$:	Gefunden:
34,15 % N.	34,16 % N.
51,22 % C.	51,37 % C.

Berechnet für 3 Mol. Wasser:	Gefunden:
24,77 % aqua.	24.05 % aqua.

Eine starke Lösung von Dimethylhypoxanthin gibt mit Silbernitrat allmälig einen in weissen, seideglänzenden Nadeln krystallisirenden Niederschlag, der beim Erwärmen der Flüssigkeit sich leicht löst.

Mit Salpetersäure und Silbernitrat entsteht ein in glasglänzenden, 4seitigen Prismen sich ausscheidender Niederschlag.

Kupfersulfat und Natriumthiosulfat fällen die Base nicht.

Kupfersulfat und Natriumbisulfit gibt nur in conc. Lösungen nach längerem Stehen einen gelblichen, aus feinen, zu Drusen vereinigten Nadeln bestehenden Niederschlag, der in Natriumthiosulfat leicht löslich ist.

Eine 1proc. Lösung von Dimethylhypoxanthin wird durch Bleiacetat und bas. Bleiacetat nicht gefällt.

Quecksilberchlorid bewirkt eine weisse Trübung, die schon beim gelinden Erwärmen in Lösung geht. Concentrirtere Lösungen geben mit Quecksilberchlorid sofort einen in kugeligen Krystallaggregaten erscheinenden Niederschlag, der in der Wärme leicht löslich ist.

Pikrinsäure bewirkt keine Fällung.

Platinchlorid erzeugt erst nach längerer Zeit einen in hell orangerothen langen und glänzenden Prismen krystallisirenden Niederschlag.

Goldchlorid erzeugt ein in hellgelben, feinen Nadeln krystallisirendes Doppelsalz.

Mit ammoniakalischer Silberlösung entsteht kein Niederschlag.

Die Existenz des Dimethylhypoxanthins beweist ebenso, wie die des Dimethylhypoxanthin-Aethyljodids, das Vorhandensein zweier durch Metalle oder Alkyle vertretbarer Imidgruppen im Hypoxanthin, wie im Adenin.

Es bleibt noch die Frage zu erledigen, ob Hypoxanthin und Adenin noch eine 3. Imidgruppe von gleicher Beschaffenheit enthalten oder ob wir im Dimethylhypoxanthin ein vollständig methylirtes Hypoxanthin vor uns haben.

Wir sehen bei Vergleichung der Homologen namentlich des Xanthins, dass mit der Einführung von Methylgruppen, d. i. der Abnahme vertretbarer Imidgruppen, die Löslichkeit der Basen erhöht wird.

Xanthin löst sich in kaltem Wasser	1 : 14,000,	in heissem .	1 : 1156.
Dimethylxanthin (Theobromin) .	1 : 1,600,	» »	1 : 55.
Trimethylxanthin (Caffeïn) . . .	1 : 74,	H_2O von 65°	1 : 2,2.

Aehnliche Verhältnisse treten uns beim Adenin, Hypoxanthin und ihren Homologen entgegen. Während Hypoxanthin in der Kälte in 300 Theilen Wasser, Adenin sogar erst in 1086 Theilen löslich ist, löst sich Monomethyladenin schon erheblich leichter, Dimethylhypoxanthin endlich ist schon in kaltem Wasser sehr leicht löslich. Bemerkenswerth ist besonders das gleichartige Verhalten des Dimethylhypoxanthins und Caffeïns zu Chloroform. Während Theobromin neben Caffeïn die einzige Xanthinbase, bei der die Löslichkeit in Chloroform in Betracht kommt, zur Lösung noch 105 Theile kochendes Chloroform braucht, werden hingegen 13 Theile Caffeïn schon in der Kälte von 100 Theilen desselben Lösungsmittels aufgenommen; ebenso löst sich Dimethylhypoxanthin ausserordentlich leicht schon in kaltem Chloroform. Wenn

demnach die Löslichkeit der Xanthin-, Adenin- und Hypoxanthinbasen durch die Anzahl der vorhandenen Methylgruppen bedingt ist, so ist kaum anzunehmen, dass im Dimethylhypoxanthin noch eine substituirbare Imidgruppe vorhanden sein sollte.

Eine noch frappantere Aehnlichkeit, als die Löslichkeit des Dimethylhypoxanthins und des Caffeïns zeigt, tritt in dem Verhalten der Basen zu Salzen von Schwermetallen entgegen.

Als vorzüglichster Beweis für das Vorhandensein von vertretbaren Imidgruppen muss die Fällbarkeit der Basen durch ammoniakalische Silberlösung angesehen werden. In der That ist ja auch bei allen Basen der Harnsäuregruppe, bei welchen auch nur eine derartige Imidgruppe mit Sicherheit constatirt ist, die genannte Reaction erhalten worden. Umgekehrt darf das vollständig methylirte Xanthin, das Caffeïn, diese Reaction nicht mehr zeigen; Caffeïn wird auch in 1 proc. und selbst stärkeren Lösungen nicht mehr gefällt. Ebenso verhält sich nun das Dimethylhypoxanthin; welches also als das vollständig methylirte Hypoxanthin angesehen werden muss.

Als weiterer Beweis für diese Behauptung kann das Verhalten des Dimethylhypoxanthins zu Kupfersulfat und Quecksilberchlorid angesehen werden. Drechsel hat vor einiger Zeit gezeigt, dass verschiedene Basen der Harnsäuregruppe, ebenso wie Harnsäure selbst, durch Fehling-sche Lösung unter Anwendung von Reductionsmitteln sehr leicht in Form unlöslicher Kupferoxydulverbindungen gefällt werden. P. Balke hat dann diese Eigenschaft bei allen bekannten Körpern der genannten Gruppe nachgewiesen, welche vertretbare Imidgruppen enthalten; eine bemerkenswerthe Ausnahme machte nur das Theobromin. Caffeïn konnte folgerichtig nicht gefällt werden. Ich habe dann später nachgewiesen, dass dieselben Verbindungen auch bei Anwendung neutraler Kupfersulfatlösung und Natriumbisulfit als Reductionsmittel entstehen, und dass die Fällung namentlich in der Wärme eine vollständige ist. So wurden Adenin, Hypoxanthin quantitativ, Methyladenin bis auf eine geringe Menge gefällt, Dimethylhypoxanthin dagegen, sowie Caffeïn gaben überein-

stimmend selbst in der Wärme und in starken Lösungen keinen Niederschlag. Nur kalte starke Lösungen von Dimethylhypoxanthin gaben nach längerem Stehen einen krystallinischen, aber in der Wärme leicht löslichen Niederschlag.

G. Bruhns hat vor längerer Zeit[1]) Verbindungen des Adenins und Hypoxanthins beschrieben, in welchen ein H-Atom desselben durch das einwerthige Radical-HgCl ersetzt war; dieselben sind in Wasser unlöslich. Auch Monomethyladenin gibt mit Quecksilberchlorid in verd. Lösungen einen flockigen Niederschlag, welcher in heissem Wasser löslich ist. Setzt man aber zu dieser Lösung Natriumcarbonat, so erscheint selbst in der Wärme sofort wieder ein weisser amorpher Niederschlag. Selbst starke Lösungen von Dimethylhypoxanthin und Caffeïn geben nun in der Wärme mit Sublimat keinen Niederschlag, selbst nach Zusatz von Soda nicht. Nur in der Kälte geben ziemlich conc. Lösungen krystallinische Doppelverbindungen.

Das Hypoxanthin hat also, wie das Adenin, nur 2 substituirbare Imidgruppen, das Adenin ausserdem noch, wie schon erwähnt, eine dritte nicht substituirbare, welche beim Behandeln mit salpetriger Säure durch Sauerstoff ersetzt wird.

7. Aethyladenin.

5 gr. Adenin wurden in 80 cbcm. Alkohol unter Zusatz von 40 cbcm. Natriumalkoholatlösung (5 gr. Natrium in 100 cbcm. Alkohol) in Lösung gebracht und die Mischung mit 12 gr. Aethyljodid 2 Stunden am Rückflusskühler erwärmt. Da innerhalb 12 Stunden sich kein Niederschlag gebildet hatte, wurde die Lösung nach dem Verdünnen mit Wasser und starkem Ansäuern mit Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure versetzt. Der Niederschlag wurde nach dem Auswaschen mit Schwefelsäure enthaltendem Wasser durch Baryt zersetzt, der Ueberschuss an letzterem durch Kohlensäure entfernt und das erhaltene Filtrat eingedampft. Erst zur Concentration bis zur Syrupdicke erstarrte die ganze Masse. Sie wurde mit Alkohol

---

[1]) Diese Zeitschr., Bd. 14, S. 567 und 570; siehe auch oben.

verrieben und mit Aether versetzt. Der zwischen Fliesspapier, dann bei 100° getrocknete Niederschlag war durch etwas anorganische Substanz verunreinigtes Monoäthyladenin, $C_5H_4(C_2H_5)N_5$.

0,1528 gr. verbrauchten 45,45 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.

Berechnet für die obige Formel:	Gefunden:
42,94 % N.	41,64 % N.

Die Verbindung ist in Alkohol und Wasser leicht löslich.

Die wässerige Lösung derselben gibt folgende Reactionen:

1. Mit $AgNO_3$ weissen, gelatinösen Niederschlag, der in heisser verd. Salpetersäure leicht löslich ist und beim Erkalten in kleinen, weissen Nadeln sich ausscheidet;

2. mit ammoniakalischer Silberlösung durchsichtigen gelatinösen Niederschlag;

3. mit Quecksilberchlorid weissen, flockigen Niederschlag;

4. mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit farblosen, gelatinösen Niederschlag;

5. mit Pikrinsäure eine schwer lösliche, in Nadeln krystallisirende Verbindung;

6. das Platindoppelsalz, in Wasser leicht löslich, krystallisirt in büschelförmigen Krystallen;

7. das Golddoppelsalz in langen Nadeln;

8. das schwefelsaure Salz des Aethyladenins scheidet sich erst aus conc. Lösungen in zu kugeligen Aggregaten vereinigten Krystallen aus.

8. Isoamyladenin.

5 gr. Adenin wurden in 100 cbcm. Alkohol plus 13,5 gr. 33 proc. Natronlauge gelöst, und die Lösung mit 15 gr. Isoamyljodid 3 Stunden am Rückflusskühler erwärmt. Darauf wurde das Gemisch in die 4fache Menge Wasser gegossen und nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure mit Aether extrahirt. Die schwefelsaure Lösung wurde mit Ammoniak neutralisirt und eingedampft; beim Eindampfen schieden sich grosse, stark glänzende Blättchen von unregelmässiger Gestalt

aus, welche nach Umkrystallisiren aus Wasser bei 148—150° schmolzen.

0,1149 gr. verbrauchten 27,9 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.

Berechnet für $C_5H_4(C_5H_{11})N_5$:	Gefunden:
34,15 % N.	33,99 % N.

Das Isoamyladenin ist in Alkohol, Aceton, Chloroform und in heissem Benzol leicht löslich, in Aether und Schwefelkohlenstoff schwer löslich. Die Löslichkeit in Wasser von gewöhnlicher Temperatur ist 1 : 1430, sie wird durch Natronlauge und Ammoniak nicht erhöht; dagegen ist der Körper in Säuren leicht löslich.

Eine 0,7 proc. Lösung von Isoamyladenin in Wasser gibt folgende Reactionen:

1. Mit Silbernitrat einen weissen, käsigen Niederschlag, der in heisser verd. Salpetersäure leicht löslich ist und beim Erkalten in spitzigen, zu Drusen vereinigten Krystallen sich ausscheidet;

2. mit ammoniakalischer Silberlösung einen weissen, voluminösen Niederschlag, der auf Zusatz von weiteren Mengen Ammoniak löslich ist;

3. mit Quecksilberchlorid einen weissen Niederschlag;

4. mit Pikrinsäure einen selbst in heissem Wasser schwer öslichen, in kleinen Nadeln krystallisirenden Niederschlag;

5. Platinchlorid erzeugt keinen Niederschlag;

6. mit Goldchlorid entsteht sofort ein in unregelmässigen, gelben Blättchen krystallirendes Doppelsalz.

9. Isoamylhypoxanthin.

4 gr. Hypoxanthin werden in 18 gr. 33 proc. Natronlauge und 120 cbcm. Alkohol gelöst und die Lösung nach Zusatz von 23 gr. Amyljodid 3 Stunden am Rückflusskühler erwärmt. Nach Verdünnen mit Wasser wird die noch stark alkalisch reagirende Flüssigkeit mit Aether ausgeschüttelt.

Beim Extrahiren dieser ätherischen Schicht mit verd. Salzsäure schied sich eine geringe Menge einer in kleinen

Nadeln krystallisirenden Substanz aus, welche ihren N-Gehalt nach salzsaures Diisoamylhypoxanthin war.

0,0644 gr verbrauchten 8,48 cbcm. 1/10 N-Oxalsäure.

Berechnet für $C_5H_2(C_5H_{11})_2N_4O \cdot HCl$:	Gefunden:
17,92 % N	18,43 % N.

Die heisse wässerige Lösung des Salzes scheidet auf Zusatz von Ammoniak die freie Base als Oel ab, welches in der Kälte krystallinisch erstarrt.

Die mit Aether extrahirte alkalische Lösung wurde mit Schwefelsäure neutralisirt. Beim Eindampfen scheidet sich ein krystallinischer Niederschlag aus, welcher getrocknet mit Aether zur Entfernung etwa noch vorhandenen Diamylhypoxanthins erschöpft, darauf am Wasser umkrystallisirt wurde. Das Monoamylhypoxanthin scheidet sich in 6 seitigen und rhombischen Blättchen aus, ist leicht in Chloroform, schwer in kaltem Wasser löslich.

0,0845 gr. verbrauchten 16,15 cbcm. 1/10 N-Oxalsäure.

Berechnet für $C_5H_3(C_5H_{11})N_4O$:	Gefunden:
27,18 % N.	26,76 % N.

Ueberführung von Adenin in Hypoxanthin.

Die Umwandlung des Adenins in Hypoxanthin wurde schon von seinem Entdecker, A. Kossel[1]), in derselben Weise ausgeführt, wie die Ueberführung des Guanins in Xanthin. nämlich durch Einwirkung von Kaliumnitrit auf die schwefelsaure Lösung des Adenin. Durch diesen Versuch wurde der entscheidende Beweis für die Zugehörigkeit des Adenins zu den Basen der Harnsäuregruppe geliefert. Die von Kossel erhaltene Ausbeute betrug 72 % der theoretischen.

Die von mir gewählte Versuchsanordnung war die folgende:

20 gr. Adenin wurden in 500 cbcm. Wasser durch Zusatz von 15 gr. conc. Schwefelsäure in der Wärme gelöst und nach dem Abkühlen auf 70° C., bei welcher Temperatur die Flüssig-

[1]) Diese Zeitschr., Bd. 10, S. 258.

keit während des Verlaufes der Reaction erhalten wurde, allmälig in Zeiträumen von je $^1/_4$ Stunde bis 10 Minuten 20 gr. Natriumnitrit hinzugesetzt unter häufigem Umschütteln des Gemisches. Da die Umwandlung noch nicht vollendet war, wurden noch 7,5 gr. Schwefelsäure und 10 gr. Natriumnitrit in derselben Weise hinzugethan. Die Reaction ist vollendet, wenn eine Probe der Flüssigkeit mit Natriumpikratlösung (in der Kälte gesättigt) nicht mehr sofort eine Trübung gibt. Ein nach längerem Stehen in gelben glänzenden Krystallen erscheinender Niederschlag ist pikrinsaures Hypoxanthin, welches nach C. Wulff gleichfalls in Wasser ziemlich schwer löslich ist, doch erst allmälig ausfällt.

Nach Beendigung der Reaction wird die Flüssigkeit unter Zusatz von Thierkohle kurze Zeit zum Sieden erhitzt, heiss filtrirt und das Filtrat mit Ammoniak neutralisirt. Alsbald beginnt das Hypoxanthin noch gelblich gefärbt sich auszuscheiden; die Menge des am nächsten Tage abfiltrirten, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschenen und getrockneten Niederschlages betrug 18 gr. = 90 % der theoretischen Ausbeute. Berücksichtigt man die Löslichkeit des Hypoxanthins in kaltem Wasser 1 : 300, so würden noch fast 2 gr. desselben in Lösung sich befinden, so dass zweifellos die Umwandlung des Adenins in Hypoxanthin auf dem angegebenen Wege quantitativ verläuft.

Man kann eine weitere Menge desselben durch Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung oder bequemer mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit erhalten.

Das erhaltene Product braucht nicht weiter gereinigt zu werden. Seinem N-Gehalte nach war es bei allen Versuchen rein.

0,1398 gr. verbrauchten 41,20 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.

Berechnet für $C_5H_4N_4O$:	Gefunden:
41,18 % N,	41,25 % N.

Bromhypoxanthin.

Das Bromhypoxanthin kann in ähnlicher Weise aus dem Bromadenin erhalten werden, wie das Hypoxanthin aus dem Adenin.

Zu dem Zwecke löst man Bromadenin[1]) in der 50fachen Menge Wasser unter Zusatz von 2 Mol. Schwefelsäure (auf 1 Mol. Bromadenin). Alsdann trägt man in die auf 70° gehaltene Flüssigkeit in derselben Weise, wie bei der Darstellung des Hypoxanthins, so lange Natriumnitrit ein, bis eine Probe derselben keinen Niederschlag mehr mit Natriumpikrat gibt. Nach Beendigung der Reaction wird das mit Thierkohle versetzte Gemisch aufgekocht, und das Filtrat zum Neutralisiren der überschüssigen Schwefelsäure mit der berechneten Menge an Soda versetzt. Innerhalb 24 Stunden scheidet sich aus der noch stark sauer reagirenden Flüssigkeit das Bromhypoxanthin als schweres Pulver aus kleinen derben Krystallen bestehend ab. Die Ausbeute beträgt 85 % der theoretischen; eine weitere Menge kann durch Versetzen des Filtrates mit ammoniakalischer Silberlösung gewonnen werden.

In dieser Form enthält das Bromhypoxanthin 2 Mol. Krystallwasser.

0,7169 gr. nehmen bei 120° ab um 0,1007 gr.
0.1747 gr. verbrauchten 28 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.

Berechnet für $C_5H_3BrN_4O + 2$ aqua:	Gefunden:
14,34 % H_2O.	14,04 % H_2O.
22,31 % N.	22,44 % N.

Häufig scheidet sich auch das Bromhypoxanthin in haarfeinen langen, zu kugeligen Aggregaten vereinigten Nadeln aus, welche mit $1^1/_2$ Mol. Wasser krystallisiren.

0,2019 gr. nehmen bei 120° ab um 0,0223 gr. und verbrauchten 33,5 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsaure.
0,3009 gr. gaben 0,2308 gr. AgBr.

Berechnet für $C_5H_3BrN_4O + 1^1/_2$ aq:	Gefunden:
11,16 % H_2O.	11,04 % H_2O.
23,14 % N.	23,23 % N.
33,06 % Br.	32,63 % Br.

[1]) Ueber die Darstellung des Bromadenins siehe diese Zeitschrift. Bd. 16, S. 4 und 330.

Reactionen des Bromhypoxanthins:

Eine wässerige Lösung desselben gibt mit Silbernitrat einen weissen, flockigen Niederschlag, der erst beim Erhitzen mit ziemlich conc. Salpetersäure sich löst.

Auf Zusatz von Ammoniak und Silbernitrat entsteht ein gelatinöser Niederschlag.

Quecksilberchlorid erzeugt einen weissen Niederschlag.

Ebenso wird es durch Kupfersulfat und Natriumbisulfit gefällt.

Weiterhin wird es gefällt in saurer Lösung durch Gerbsäure, Phosphorwolfram- und Phosphor-Molybdänsäure.

Mit bas. Bleiacetat gibt es weissen Niederschlag.

Nicht gefällt wird es durch Bleiacetat und Barytwasser.

Das Bromhypoxanthin ist in Wasser schwer, in Säuren und Alkalien leicht löslich. Die wässerige Lösung reagirt stark sauer.

Der Körper hat die Eigenschaften einer Base und Säure. Alkalien und Alkalicarbonaten gegenüber verhält es sich wie Harnsäure, d. h. er vermag aus letzteren Kohlensäure auszutreiben. Leitet man in eine Lösung von Bromhypoxanthin in Natronlauge Kohlensäure ein, so fällt nicht Bromhypoxanthin wieder aus, sondern es scheidet sich, wenn die Lösung nicht zu verdünnt war, die Natriumverbindung des Bromhypoxanthins in langen seideglänzenden Prismen aus. Derselbe Körper entsteht auch beim Erhitzen von Bromhypoxanthin mit Soda; er hat die Zusammensetzung: $C_5H_2NaBrN_4O + 2$ aq.

0,1895 gr. verbrauchten 27,6 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.

0,3762 gr. gaben 0,1000 gr. Na_2SO_4 (mit Schwefelsäure zerstört).

0,2625 gr. nehmen bei 130° ab um 0,0338 gr.

0,2147 gr. gaben nach Carius 0,1490 gr. AgBr.

Berechnet für die obige Formel:	Gefunden:
20,51 % N.	20,39 % N.
29,30 % Br.	29,53 % Br.
8,42 % Na.	8,40 % Na.
13,19 % H_2O.	12,88 % H_2O.

Die Natriumverbindung des Bromhypoxanthins ist in heissem Wasser leicht löslich, in kaltem ziemlich schwierig;

die Lösung reagirt alkalisch. Zur Darstellung des freien Bromhypoxanthins löst man die Natriumverbindung in Wasser und versetzt mit der berechneten Menge einer Säure.

Die Baryumverbindung des Bromhypoxanthins wurde durch Lösen von Bromhypoxanthin in überschüssigem Barytwasser und Einleiten von Kohlensäure dargestellt. Beim Einengen des Filrates scheidet sie sich in feinen, weissen Nadeln aus.

Die Verbindung krystallisirt mit 3 Mol. Wasser, welche bei 100° noch nicht entweichen.

0,1830 gr. verbrauchten 23,70 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.
0,3069 gr. gaben 0,1165 gr. $BaSO_4$.

Berechnet für $(C_5H_2BrN_4O)_2Ba + 3$ aq:	Gefunden:
18,09 % N.	18,30 % N.
22,13 % N.	22,32 %.

Die Bleiverbindung scheidet sich auf Zusatz von 1 Mol. Bleiacetat zu einer Lösung von Bromhypoxanthin (1 Mol.) in 2 Mol. Aetznatron als amorpher Niederschlag aus.

Im Bromhypoxanthin ist das Brom ebenso fest gebunden. wie in Bromadenin. Selbst nach 3 stündigem Erhitzen einer Lösung desselben in 10 proc. alkoholischer Kalilauge, welche mit so viel Wasser versetzt wurde, dass das Bromhypoxanthin in Lösung ging, war noch keine Spur Brom abgespalten.

Auch mit dem Bromadenin wurden noch einzelne Versuche gemacht, das Brom durch Radicale zu ersetzen, jedoch vergeblich. So wurde nach 4 stündigem Erwärmen von Bromadenin in 10 proc. wässeriger Kalilauge mit Phenol, um ein Phenoxyladenin darzustellen, nur unverändertes Adenin wiedererhalten.

Selbst beim Erwärmen von Bromadeniu mit conc. Kalilauge bis zu einer Temperatur von 180—190° blieb der Körper unangriffen.

Einwirkung von Brom auf Hypoxanthin.

Schon Bruhns[1]) hatte versucht, durch directe Einwirkung von Brom auf Hypoxanthin zu einem Bromhypo-

[1]) Diese Zeitschr., Bd. 16, S. 12.

xanthin zu gelangen; er gibt an, dass das Hypoxanthin durch trockenes Brom selbst im geschlossenen Rohr bei 100° nicht bromirt werden könne. Diese Angabe ist jedoch unrichtig.

Bei gewöhnlicher Temperatur wirkt trockenes Brom auf Hypoxanthin allerdings nicht ein; lässt man dagegen die Reaction bei 100° oder einer noch höheren Temperatur, welche bis 150° steigen kann, vor sich gehen, so findet eine quantitative Umwandlung des Hypoxanthins in Bromhypoxanthin statt, wie folgende Versuche beweisen.

Vollständig getrocknetes Hypoxanthin wurde mit einem Ueberschuss von trockenem Brom während 6 Stunden im Wasserbade, oder in einem Ofen auf 120°, resp. 150° erwärmt. In allen Fällen war das Endproduct eine dunkelrothe, feste und glitzernde Masse von krystallinischem Gefüge. Wurde jetzt die Röhre geöffnet und das überschüssige Brom durch Erhitzen der Röhre im Wasserbade vertrieben, so entsprach das Gewicht des Rückstandes einer Zunahme von 3 Mol. Brom auf 1 Mol. Hypoxanthin; Dieses Product ist analog dem von Bruhns (l. c.) beschriebenen bromwasserstoffsaurem Bromadenin-Tetrabromid. Es ist das Tetrabromid des Bromhypoxanthin-Bromhydrates, $C_5H_3BrN_4O.HBr.Br_4$. Der Körper riecht stark nach Brom, gibt aber in der Kälte das addirte Brom nur sehr langsam ab, in der Wärme bei 120° aber schnell. Der jetzt restirende Körper ist Bromhypoxanthin-Bromhydrat, $C_5H_3N_4BrO.HBr$.

Versuche.

1. 1,737 gr. Hypoxanthin wurden mit überschüssigem Brom 6 Stunden auf 150° erwärmt. Nach dem Vertreiben des überschüssigen Broms erhalten 7,9 gr. Verlangt bei 1,737 gr. Hypoxanthin für $C_5H_3BrN_4O.HBr.Br_4$ 7,87 gr.

   Nach dem Trocknen bei 120° blieben 4 gr. $C_5H_3N_4BrO.HBr$; verlangt sind 3,77 gr.

2. 1,365 gr. Hypoxanthin in derselben Weise behandelt.

   Gefunden 6,4 gr. Tetrabromid, verl. 6,18 gr.,
   » 2,9 gr. Bromhydrat, » 2,97 gr.

3. 0,813 gr. 6 Stunden auf 100° erwärmt.

   Gefunden 3,67 gr. Tetrabromid, verl. 3,68 gr.,
   » 1,65 gr. Bromhydrat, » 1,77 gr.

4. 1,02 gr. 6 Stunden auf 120° erwärmt.

Gefunden 4,86 gr. Tetrabromid, verl. 4,62 gr.,
» 2,12 gr. Bromhydrat, » 2,21 gr.

Diese Ergebnisse sprechen unzweifelhaft dafür, dass ein Bromhypoxanthin entstanden sein muss; dennoch gelang es bei den ersten Versuchen, als das Verhalten des Bromhypoxanthins Basen gegenüber noch nicht bekannt war, nicht das freie Bromhypoxanthin zu gewinnen. Als die rückständigen Producte, welche aus dem bromwasserstoffsauren Bromhypoxanthin bestehen mussten, durch schweflige Säure zunächst entfärbt, dann in heissem Wasser gelöst wurden, und die Lösung mit Ammoniak neutralisirt wurde, schied sich erst erst beim Einengen eine Substanz aus, deren N-Gehalt bei den einzelnen Versuchen verschieden war, aber zwischen den für Hypoxanthin und Bromhypoxanthin berechneten lag. In einem Falle betrug der N-Gehalt 30,23 % N, eine Zahl, welche mit dem für eine Ammonverbindung des Bromhypoxanthins $C_5H_2Br.N_4O.NH_4$ gut übereinstimmt, verlangt ist für dieses Salz 30,17 %. In der That enthielt dieses Präparat, wie die übrigen, deren N-Gehalt um mehrere Procent niedriger war, sowohl Brom, wie Ammoniak. Dass es so schwer gelang, die Ammoniakverbindung in reinem Zustande zu erhalten, liegt jedenfalls an ihrer leichten Zersetzlichkeit.

Bei späteren Versuchen wurde daher die Isolirung des Bromhypoxanthins mit Hilfe seiner Natriumverbindung bewerkstelligt, und zu dem Zwecke die Lösung des Bromhydrates mit Natronlauge übersättigt und dann Kohlensäure eingeleitet oder auch direct mit Soda übersättigt. Beim Eindampfen schied sich dann das Natriumsalz in der oben beschriebenen Form ab und kann durch Umkrystallisiren leicht gereinigt werden.

Spaltung des Bromhypoxanthins durch Salzsäure und chlorsaures Kali.

In meiner 2. Mittheilung über Adenin habe ich gezeigt, dass das Bromadenin bei der Oxydation mit Salzsäure und chlorsaurem Kali Alloxan und Harnstoff liefert. Die Ausbeute an Alloxan war jedoch nur eine geringe.

Guanin liefert, trotzdem es einen Alloxankern enthält, bei der Oxydation mit Salzsäure und chlorsaurem Kali nur Parabansäure neben Guanidin, während Xanthin ziemlich glatt in Alloxan und Harnstoff zerfällt. Das Vorhandensein eines Guanidinkernes scheint demnach die Entstehung des Alloxans zu verhindern, das eines Harnstoffkernes dieselbe zu begünstigen. Aus demselben Grund konnte auch die Ausbeute an Alloxan beim Adenin, welches jedenfalls einen Guanidinkern enthält, eine so geringe sein; und es war zu erwarten, dass durch Ueberführung des Bromadenins in Bromhypoxanthin und Oxydation des letzteren mit denselben Reagentien die Ausbeute an dem genannten Körper eine bessere sein würde.

17,5 gr. wasserfreies Bromhypoxanthin wurden mit 50 cbcm. Wasser plus 20 cbcm. Salzsäure (1,19 spec. Gew.) übergossen und in das auf 60° erwärmte Gemisch allmälig 7,5 gr. chlorsaures Kali eingetragen. Die Operation dauerte etwa 2 Stunden; das Bromhypoxanthin ging vollständig in Lösung. Dieselbe wurde mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt. Die restirenden Mengen an Chlor und Brom wurden zunächst durch einen Luftstrom vertrieben, und der Rest durch Schwefelwasserstoff reducirt. Hierbei schied sich nur ein geringer Niederschlag aus, der kein Alloxantin enthielt. Das Filtrat wurde daher im Vacuum bis zur Syrupdicke abdestillirt und der Rückstand mit Alkohol extrahirt. Der in Alkohol unlösliche Theil wurde nach dem Auswaschen mit wenig kaltem Wasser aus heissem Wasser umkrystallisirt. Innerhalb 12 Stunden schieden sich die monoklinen, 6flächigen Säulchen des Alloxantins aus in einer Menge von etwa 1 gr.

0,2625 gr. verbrauchten 32,7 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.
0,3687 gr. gaben 0,4112 gr. CO_2 und 0,1092 gr. H_2O.

Berechnet für $C_8H_4N_4O_7 + 3$ aq:	Gefunden:
17,39 % N.	17,44 % N.
29,81 % C.	30,41 % C.
3,11 % H.	3,29 % H.

Das erhaltene Product gab die für Alloxantin characteristischen Reactionen: veilchenblauen Niederschlag mit Barytwasser,

Reduction von ammoniakalischer Silberlösung und Blaufärbung mit Eisenvitriol und Ammoniak.

Die oben erwähnte alkoholische Lösung des Verdampfungsrückstandes wurde mit Bleicarbonat bis zur Neutralisation digerirt, dann nach Zusatz von Bleioxyd zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit abs. Alkohol extrahirt und das Filtrat, mit dem gleichen Volumen Aether versetzt, 12 Stunden stehen gelassen. Beim Eindampfen des nunmehrigen Filtrates schieden sich kleine, schwach glänzende Prismen aus. Der Körper enthielt 47,10% N (berechnet für Harnstoff 46,67% N). Er gab in wenig H_2O gelöst mit conc. Oxalsäurelösung und mit starker Salpetersäure Niederschläge. Die salpetersaure Verbindung zeigte auch hier, wie es bei der Spaltung des Bromadenins bemerkt wurde, nicht die charakteristischen 6seitigen und rhombischen Blättchen des salpetersauren Harnstoffes; dennoch gab auch hier wieder die Analyse der oxalsauren Verbindung mit den für oxalsauren Harnstoff berechneten gut übereinstimmende Werthe.[1] In wenig Wasser gelöst und mit 10proc. Oxalsäurelösung übergossen, lieferte der Körper kugelige Aggregate prismatischer Krystalle.

0,2074 gr. verbrauchten 19,55 cbcm. Kaliumpermanganatlösung (gegen $^1/_{10}$ N-Oxalsäure eingestellt) zur Oxydation.

0,1708 gr. verbrauchten 33,2 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.

Berechnet für $(CON_2H_4)_2 . C_2H_2O_4$:	Gefunden:
42,86% Oxalsäure.	42,42% $C_2H_2O_4$.
26,67% N.	27,21% N.

Auch Bromhypoxanthin zerfällt demnach bei der Oxydation in Alloxan und Harnstoff; die Ausbeute an ersterem ist jedoch nicht grösser, als bei der Spaltung des Bromadenins. Eine Erklärung für diese Erscheinung ist nur in der von mir schon früher[1]) gemachten Annahme zu suchen, dass der Alloxankern des Adenin- und Hypoxanthin-Molecüls einer leichteren Spaltung in einfachere Producte ausgesetzt ist, welche durch eine anderweitige Vertheilung der Valenzen

---

[1]) Diese Zeitschr., Bd. 16, S. 338.

zwischen C- und N-Atomen, als sie im Alloxankern des Xanthins vorhanden ist, etwa durch das Vorhandensein einer 2. doppelten Bindung bedingt ist.

Spaltung der Alkylderivate des Adenins und Hypoxanthins durch Salzsäure.

In meiner ersten[1]) Mittheilung über Adenin ist gezeigt, worden, dass Adenin nach 12stündigem Erwärmen mit conc. Salzsäure auf 180—200° quantitativ zersetzt ist in:

1 Mol. Kohlensäure, 2 Mol. Ameisensäure,
4 Mol. Ammoniak und 1 Mol. Amidoessigsäure.

Für die weitere Kenntniss der Constitution des Adenins musste es von wesentlicher Bedeutung sein, zu erfahren, ob nach Substituirung der beiden im Adenin enthaltenen (s. oben), vertretbaren Imidgruppen die Alkyle in Form von Alkylaminen unter den Spaltungsproducten sich finden, oder eins als alkylirte Amidoessigsäure auftritt.

Es wurden desshalb einige der oben beschriebenen Alkylderivate des Adenins und Hypoxanthins in derselben Weise, wie es bei Adenin angegeben, zersetzt.

1. Spaltung des Monobenzyladenins und des Dibenzyladenins.

Um festzustellen, ob die Zersetzung in quantitativer Weise erfolgt, wurde zunächst eine geringe Menge 0,5 gr. Monobenzyladenin mit 10 cbcm. conc. Salzsäure während 12 Stunden auf 180—200° erwärmt, das Gemisch hiernach auf 250 cbcm. angefüllt, und in einem bestimmten Theil der Flüssigkeit die Menge der flüchtigen Basen durch Auffangen in $^1/_{10}$-N-Oxalsäure bestimmt. Es zeigte sich, dass auch hier genau 4 Atome in Form von flüchtigen Verbindungen abgespalten waren, während das 5. N-Atom in einer Amidosäure enthalten sein musste. Während aber beim Adenin das Reactionsproduct eine vollkommen klare Flüssigkeit mit Krystallen von Salmiak darstellte, zeigte sich hier nach dem

---

[1]) Diese Zeitschr., Bd. 16, S. 167.

Oeffnen der Einschlussröhre auf der Oberfläche der Salzsäure eine braunschwarz gefärbte zähe Masse, welche beim längeren Stehen etwas fester wurde.

Diese Masse konnte entweder das noch unbekannte Benzylglycocoll darstellen, oder aber ein Reactionsproduct von Salzsäure auf die Benzylgruppe. War letzteres der Fall, so musste bei der Einwirkung von Salzsäure auf Benzyladenin die Benzylgruppe abgespalten sein und dieselbe konnte alsdann nicht mehr zur Characterisirung eines N-Atomes dienen.

Zur Entscheidung der Frage, ob neben dem öligen Producte sich noch Glycocoll unter den Spaltungsproducten findet, wurden 4,5 gr. Benzyladenin mit einem Gemisch von 2 Vol. Wasser und 1 Vol. conc. Schwefelsäure in derselben Weise zersetzt. Auch hier hatte sich wieder die dunkle schmierige Masse gebildet. Nach dem Verdünnen mit Wasser und nach Filtration wurde das Filtrat mit überschüssigem Barythydrat erwärmt, bis keine alkalischen Dämpfe mehr entwichen. Zur Entfernung des überschüssigen Baryts wurde dann Kohlensäure eingeleitet, filtrirt, das Filtrat mit frisch gefälltem Kupferoxyd längere Zeit in der Wärme digerirt. Das nunmehr erhaltene lasurblau gefärbte Filtrat schied beim Erkalten blau gefärbte Krystallnadeln aus.

0,2506 gr. verbrauchten 21,6 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.

Berechnet für $(NH_2 . CH_2 . COO)_2 Cu + H_2O$:	Gefunden:
12,23 % N.	12,07 % N.

Die Verbindung ist also Glycocollkupfer. Hiermit ist bewiesen, dass neben dem dunkelbraunen Producte noch Glycocoll entsteht, und dass bei Einwirkung von Salzsäure die Benzylgruppe abgespalten wird.

Obwohl anzunehmen war, dass das Dibenzyladenin sich ähnlich verhalten würde, wurde dennoch derselbe Versuch auch mit diesem Körper gemacht.

0,5939 gr. salzsaures Dibenzyladenin wurde durch 14stündiges Erhitzen mit conc. Salzsäure auf 180—200° zersetzt. Auch hier hatte sich derselbe harzige Körper gebildet. Die salzsaure Lösung wurde mit Wasser auf 250° angefüllt:

50 cbcm. derselben, entsprechend 0,11878 gr. des Ausgangsmaterials, wurden mit Natronlauge destillirt und die übergehenden flüchtigen Basen in $^1/_{10}$-N-Oxalsäure aufgefangen.

Verbraucht wurden zur Neutralisation 13,25 cbcm. der Säure, entsprechend 0,01855 gr. N und 15,61 % N (für $HCl . C_5H_3(_7H_{11})_2N_5$ berechnet). Von den 5 N-Atomen sind demnach wiederum 4 Atome (berechnet 15,93 % N) in Form flüchtiger Basen abgespalten, ein Beweis, dass die Zersetzung des Dibenzyladenins gleichfalls quantitativ verläuft. Da aber auch bei diesem Körper eine Abspaltung der Benzylgruppe durch das Auftreten des Harzes angezeigt war, wurde auf die weitere Feststellung der Zersetzungsgleichung verzichtet, und es wurden für die fernere Untersuchung die Methylderivate des Adenins und Hypoxanthins gewählt.

Der bei der Spaltung des Mono- und Dibenzyladenins durch Salzsäure oder Schwefelsäure erhaltene harzige Körper ist jedenfalls mit dem von Cannizzaro (Ann. d. Chem. u. Pharm., Bd. 92, S. 114) beschriebenen, aus Benzylalkohol durch Einwirkung wasserentziehender Mittel erhaltenen Kohlenwasserstoff $C_{14}H_{12}$ identisch.

2. Spaltung des Monomethyladenins durch Salzsäure.

Für diesen Versuch wurde das Methyladenin angewendet, welches durch Einwirkung von Methyljodid auf die kalte Lösung von Adenin in alkoholischer Natronlauge erhalten war (s. Seite 434).

0,577 gr. wurden durch Schwefelsäure (2 Vol. Wasser, 1 Vol. conc. Schwefelsäure) in der angegebenen Weise zersetzt. Das Gemisch auf 250 cbcm. aufgefüllt.

1. 50 cbcm., entsprechend 0,1154 gr. Methyladenin, mit Natronlauge destillirt, verbraucht zur Neutralisation der übergehenden Basen 31,20 cbcm. $^1/_{10}$-N-Oxalsäure; gefunden demnach 37,85 %. Berechnet für 4 Atome N im Methyladenin 37,58 % N.

2. 100 cbcm. der Flüssigkeit, entsprechend 0,2308 gr. Methyladenin, mit Natronlauge destillirt, das Destillat in Salzsäure aufgefangen. Der Rückstand der salzsauren Lösung

auf dem Wasserbade getrocknet, betrug 0,3541 gr. Die Lösung desselben in wenig Wasser gab mit Platinchlorid einen Niederschlag, der neben den Octaëdern des Platinsalmiaks die characteristischen 6 seitigen Blättchen des salzsauren Methylamin-Platinchlorids zeigte. Die Methylgruppe im Methyladenin ist also als Methylamin abgespalten worden. Die bei Destillation mit Natronlauge übergehenden Basen müssen daher aus 3 Molecülen Ammoniak und 1 Mol. Methylamin bestehen. Berechnet man die Menge der salzsauren Salze, welche bei einer derartigen Zersetzung aus 0,2308 gr. Methyladenin entstehen müssen, nach folgender Gleichung:

$$C_5H_4(CH_3)N_5 : [3\,NH_4Cl + 1\,CH_3.NH_3Cl] = 0{,}2308 : x,$$

so ergibt sich für x der Werth 0,3532; gefunden sind 0,3541 salzsaure Salze.

Die Abspaltung des Methyls als Methylamin ist also eine quantitative, was ja auch unter Voraussetzung eines einheitlichen Ausgangsmaterials bei der glatten Spaltung desselben (s. die N-Bestimmung) erwartet werden musste. Auf etwa vorhandenes Methylglycocoll (Sarkosin) brauchte daher nicht gefahndet zu werden. Die Zersetzung des Methyladenins muss daher nach folgender Gleichung verlaufen:

$$C_5H_4(CH_3)N_5 + 8\,H_2O = 3\,NH_3 + CH_3NH_2 + CO_2 + 2\,H.COOH + NH_2.CH_2.COOH.$$

Es entstehen 3 Molecüle Ammoniak, 1 Mol. Methylamin, 1 Mol. Glycocoll, 1 Mol. Kohlensäure und 2 Mol. Ameisensäure, resp. Kohlenoxyd. Mit Ausnahme des Methylamins, für welches beim Adenin ein 4. Mol. Ammoniak gefunden war, sind daher die Spaltungsproducte dieselben, wie beim Adenin.

3. Spaltung des Dimethylhypoxanthins durch Salzsäure.

Von den 4 N-Atomen des Hypoxanthins müssen, wie ich schon früher erwähnt habe, 3 in Form von Ammoniak, das 4. im Glycocoll unter den Producten bei der Spaltung durch Salzsäure vorhanden sein. Die Versuche mit Dimethylhypoxanthin bestätigen diese Vermuthung vollkommen.

0,5102 gr. wurden mit conc. Salzsäure 12 Stunden auf 180—200° erwärmt, und das Product auf 250 cbcm. ausgefüllt.

1. 50 cbcm. = 0,10204 gr. Dimethylhypoxanthin mit NaOH destillirt, verbraucht zur Neutralisation der übergehenden Basen 18,7 cbcm. $^1/_{10}$-N-Oxalsäure. Gefunden 25,66 % N. Berechnet für 3 Atome N: 25,61 % N.

2. 150 cbcm. = 0,30612 gr. Dimethylhypoxanthin mit NaOH destillirt; Destillat in Salzsäure aufgefangen; Rückstand der salzsauren Lösung = 0,3300 gr. Die Lösung in Wasser gibt wieder mit Platinchlorid versetzt Krystalle der Doppelsalze des Salmiaks und des Methylaminchlorhydrates.

Da im Dimethylhypoxanthin 4 N-Atome, von denen 3 in Form flüchtiger Basen (s. die N-Bestimmung) abgespalten werden und 2 Methylgruppen vorhanden sind, so muss wenigstens 1 Mol. Methylamin entstanden sein; es können aber auch beide Methylgruppen als Methylamin abgespalten sein.

Berechnet man nun die Menge der salzsauren Salze, welche aus 0,30612 gr. Dimethylhypoxanthin erhalten werden müssen, unter der Annahme, dass die überdestillirten Basen 2 Mol. Methylamin und 1 Mol. Ammoniak enthalten, so müsste der Rückstand 0,3518 gr. betragen. Besteht der Rückstand dagegen aus den Chlorhydraten von 2 Mol. Ammoniak und 1 Mol. Methyladenin, so sollte er theoretisch 0,3255 gr. betragen; gefunden ist 0,3300 gr.

Die Zersetzung des Dimethylhypoxanthins findet also unter Bildung von 1 Mol. Methylamin und 2 Mol. Ammoniak statt; und es muss die 2. Methylgruppe, welche zweifellos gleichfalls an Stickstoff gebunden ist, im Sarkosin sich finden.

Zum Nachweis des letzteren wurden 3 gr. Dimethylhypoxanthin unter Anwendung von Schwefelsäure (vergl. Monobenzyladenin) zersetzt. Das Reactionsproduct wurde zur Entfernung der Schwefelsäure und der flüchtigen Basen in der bei Monobenzyladenin angegebenen Weise behandelt. Die schliesslich nach dem Kochen mit Kupferhydroxyd erhaltene blaue Flüssigkeit wurde stark eingedampft. Es schieden sich erst über Nacht grosse, tief lasurblau gefärbte, anscheinend rhombische 4seitige Säulen aus, welche nach dem

Auswaschen mit Alkohol und Trocknen an der Luft reines Sarkosin-Kupfer darstellten.

0,2337 gr. nahmen bei 120° ab um 0,0308 gr. und verbrauchten 16,65 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.

0,2278 gr. gaben 0,2167 gr. CO_2 und 0,1247 H_2O.

Sarkosin-Kupfer verl. $(CH_3NH.CH_2.COO)_2Cu + 2$ aq:	Gefunden:	Glycocoll-Kupfer verl. $(NH_2.CH_2.COO)_2Cu + 1$ aq:
10,16 % N.	9,97 % N.	12,21 % N.
26,14 % C.	25,94 % C.	20,92 % C.
5,81 % H.	6,08 % H.	4,36 % H.
13,07 % H_2O.	13,13 % H_2O.	7.85 % H_2O.

Die Zersetzung des Dimethylhypoxanthins verläuft daher nach folgender Gleichung:

$$C_5H_2(CH_3)_2N_4O + 7\,H_2O = 2\,NH_3 + CH_3.NH_2 + CO_2 + 2\,H.COOH + CH_3.NH.CH_2.COOH.$$

Die Schlüsse, welche die experimentellen Untersuchungen in Bezug auf die Constitution des Adenins und Hypoxanthins zu ziehen gestatten, sollen in einem weiteren theoretischen Theil erörtert werden.

Die Constitution des Adenins und Hypoxanthins.

Von

Martin Krüger.

(IV. Mittheilung.)

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts zu Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 7. September 1893.)

Die Constitution der Harnsäure, des Xanthins und seiner Homologen muss nach den umfangreichen bekannten Untersuchungen, namentlich E. Fischer's, als vollständig aufgeschlossen betrachtet werden. Bei der Formel des Guanins, welches aus dem Xanthin durch Umwandlung einer Carbonyl- in eine Carbimidgruppe entstanden zu denken ist, ist höchstens noch zweifelhaft, an welcher Stelle sich diese Carbimidgruppe befindet. Ueber die Constitution des Hypoxanthins hingegen weiss man aus den früheren Untersuchungen noch nichts. Nur soviel muss man mit Sicherheit annehmen, dass es zweifellos zu den Basen der Harnsäuregruppe gehört: einmal weil eine grosse Anzahl seiner Reactionen mit denen der genannten Körperklasse übereinstimmt, dann auch weil das Molecül des Hypoxanthins dieselbe Anzahl von C- und N-Atomen enthält, wie die des Xanthins und der Harnsäure und sich nur durch einen Mindergehalt von einem, resp. zwei Sauerstoffatomen von letzteren unterscheidet.

Die letztere Beziehung des Hypoxanthins zur Harnsäure und zum Xanthin musste den Versuch anregen, die 3 Körper

durch Reduction oder Oxydation in einander überzuführen. So wollte Strecker[1]) durch Oxydation des Hypoxanthins mit Salpetersäure Xanthin erhalten haben; ebenso sollte, durch Einwirkung von natriumarmen Natriumamalgam auf Harnsäure[2]) nach Versuchen von Rheineck, die auf Veranlassung Strecker's ausgeführt sind, Xanthin und sogar Hypoxanthin erhalten worden sein. Die Resultate des ersten Versuches sind von A. Kossel[3]) und später von E. Fischer[4]) widerlegt worden. Als ebenso unrichtig erwies sich nach Angabe des letzteren die Reduction der Harnsäure zu Xanthin und Hypoxanthin.

Ich habe auf anderem Wege, nämlich durch Einwirkung feuchten Broms bei höheren Temperaturen, versucht, Hypoxanthin in Xanthin überzuführen. Um die genau berechnete Menge an Wasser dem Brom hinzusetzen zu können, wurde ein krystallwasserhaltiges Salz, nämlich $NaBr + 2\,H_2O$, gewählt. Eine gewogene Menge Hypoxanthins wurde mit der für 1 Mol. Wasser berechneten Menge Natriumbromids und einem Ueberschuss an Brom während 8 Stunden auf 150—160° erwärmt. Die Röhren öffneten sich nach dem Erkalten unter starkem Druck und liessen grosse Mengen an Bromwasserstoffsäure entweichen. Es wurden aber bei weiterer Verarbeitung des Rückstandes nur bromhaltige Producte von verschiedenem N-Gehalte gefunden, welche bei ihrer leichten Löslichkeit in Wasser und verd. Säuren weder Xanthin noch Bromxanthin enthalten konnten.

Wären die Strecker'schen Versuche von den späteren Autoren bestätigt worden, so wäre damit das Wesentliche an der Constitution des Hypoxanthins, nämlich die Gruppirung der N- und C-Atome, festgestellt worden, und es würde nur noch die Vertheilung der H- und des O-Atomes übrig geblieben sein. Die Gruppirung der C- und N-Atome hätte

---

[1]) Ann. d. Chem. u. Pharm., Bd. 108, S. 156.
[2]) Ann. d Chem. u. Pharm., Bd. 131, S. 121.
[3]) Diese Zeitschr., Bd. 6, S. 426.
[4]) Ber. d. d. chem. Ges., 1884, S. 329.

dann in derselben Weise gedacht werden müssen, wie sie beim Xanthin und der Harnsäure ist:

```
     N — C
   /     |
C <      C — N
   \     |     > C,
     N — C — N
```

und die Beziehung des Hypoxanthins zum Xanthin würde dann, wie E. Fischer[1]) sagt, am Einfachsten verständlich sein, wenn man im Hypoxanthin an Stelle eines Harnstoffrestes des Xanthins die Atomgruppe N = CH — N annimmt, unter welcher Voraussetzung sich 3 Formeln für Hypoxanthin ergeben würden.

Nach Widerlegung der Strecker'schen Versuche fehlt jedoch bisher jeder experimentelle Beweis für den zweifellos bestehenden Zusammenhang zwischen Hypoxanthin, Xanthin und der Harnsäure.

Dasselbe gilt von Adenin, welches nach A. Kossel[2]) durch Behandlung mit salpetriger Säure in Hypoxanthin umgewandelt wird:

$$C_5H_4N_4(NH) + HNO_2 = C_5H_4N_4O + N_2 + H_2O.$$

Das Adenin enthält also eine Imidgruppe dort, wo das Sauerstoff-Atom des Hypoxanthins sich befindet. Da Hypoxanthin nur ein Sauerstoff-Atom besitzt, so muss mit Kenntniss der Constitution des einen der beiden Körper auch die des anderen aufgeschlossen sein.

Die umfassenden Versuche E. Fischer's[3]) über das Caffeïn schienen einen geeigneten Weg zur Ermittelung der Constitution des Adenins und Hypoxanthins anzugeben; doch versagte schon der erste Schritt auf diesem Wege, da es nicht gelang weder im Bromadenin[4]) noch im Bromhypoxanthin[5]) das Brom durch Hydroxyl oder Amidogruppen zu ersetzen.

---

[1]) Ber. d. d. chem. Ges., 1882, S. 455.

[2]) Diese Zeitschr., Bd. 18, S. 258.

[3]) Ann. d. Chem. u. Pharm., Bd. 215, S. 253.

[4]) Diese Zeitschr., Bd. 16, S. 10.

[5]) Ebendaselbst, Bd. 18, S. 448.

Die bisherigen über Adenin und Hypoxanthin erhaltenen Resultate sind, soweit sie für die Ermittelung der Constitution der genannten Körper von Wichtigkeit sind, die folgenden:

1. Adenin[1]) gibt, ebenso wie Xanthin, Guanin und Caffeïn, ein Monobromderivat, dessen bromwasserstoffsaures Salz noch 4 Atome Brom zu addiren vermag. Dieselben Eigenschaften zeigt Hypoxanthin[2]). Adenin und Hypoxanthin enthalten demnach 2 doppelte Bindungen, welche durch Anlagerung von Brom in einfache übergeführt werden können. Jedenfalls ist auch bei diesen beiden, wie bei den übrigen Monobromderivate liefernden Körpern der Harnsäuregruppe, das durch Brom ersetzbare Wasserstoffatom in Form einer CH-(Methenyl)-gruppe vorhanden.

2. Die Existenz des Dimethylhypoxanthins[3]), welches mit dem Caffeïn in allen Eigenschaften übereinstimmt, beweist, dass Hypoxanthin und Adenin 2 durch Metalle und Alkyle vertretbare Imidgruppen enthalten. Das Adenin enthält ausserdem noch eine 3. Imidgruppe, welche dem O-Atom des Hypoxanthins entspricht.

3. Bei der Oxydation des Bromadenins[4]) und Bromhypoxanthins[5]) mit Salzsäure und chlorsaurem Kali entsteht Alloxan neben grösseren Mengen von Harnstoff. Hiermit ist bewiesen, dass Adenin und Hypoxanthinkern einen Alloxankern enthalten; ob ausserdem ein Harnstoffkern vorhanden ist, ist noch zweifelhaft.

4. Bei der Zersetzung des Hypoxanthins und des Adenins[6]) durch conc. Salzsäure entstehen qualitativ dieselben Producte, wie bei der Spaltung des Xanthins und der Harnsäure.

5. Durch Einwirkung conc. Salzsäure auf Monomethyladenin[7]) wird die Methylgruppe als Methylamin abgespalten.

---

[1]) L. c.

[2]) L. c.

[3]) Diese Zeitschr., Bd. 18, S. 436.

[4]) Ebendaselbst, Bd. 16, S. 333.

[5]) Ebendaselbst, Bd. 18, S. 450.

[6]) Ebendaselbst, Bd. 16, S. 167.

[7]) Ebendaselbst, Bd. 18, S. 455.

6. Aus Dimethylhypoxanthin[1]) entsteht bei derselben Behandlung Methylamin und Methylglycocoll.

Für die Constitution des Hypoxanthins und Adenins wichtige Aufschlüsse und mannigfache Beziehungen zur Harnsäure und zum Xanthin hat namentlich die Spaltung durch Salzsäure gegeben. Die Spaltung des Hypoxanthins beim Erhitzen mit conc. Salzsäure auf 180—200° muss nach den beim Adenin und Dimethylhypoxanthin erhaltenen Resultaten nach der folgenden Gleichung erfolgen, welche mit den Zersetzungsgleichungen für Harnsäure und Xanthin zusammengestellt werden soll:

Harnsäure: $C_5H_4N_4O_3 + 5\,H_2O = NH_2.CH_2.COOH + 3\,NH_3 + 3\,CO_2 + —.$

Xanthin: $C_5H_4N_4O_2 + 6\,H_2O = NH_2.CH_2.COOH + 3\,NH_3 + 2\,CO_2 + 1\,H.COOH.$

Hypoxanthin: $C_5H_4N_4O + 7\,H_2O = NH_2.CH_2.COOH + 3\,NH_3 + 1\,CO_2 + 2\,H.COOH.$

Alle 3 Körper liefern bei der Spaltung 3 Mol. Ammoniak und 1 Mol. Glycocoll. Nur das Verhältniss von Kohlensäure zu Ameisensäure ist entsprechend dem O-Gehalte der Ausgangsmaterialien verschieden. Die Anzahl der CO_2-Mol. entsprechen den O-Atomen der gespaltenen Körper.

Eine bemerkenswerthe Beziehung findet ausserdem zwischen der Anzahl der O-Atome und der Anzahl der vertretbaren Imidgruppen statt:

Harnsäure enthält 3 O-Atome und 4 Imidgruppen;
Xanthin » 2 O-Atome » 3 Imidgruppen.

Hieraus wird man schliessen können, dass das nur 1 O-Atom enthaltende Hypoxanthin auch nur 2 Imidgruppen enthält. In der That ist ja das Dimethylhypoxanthin als vollkommen methylirtes Hypoxanthin aufzufassen.

Es war oben gesagt worden, dass die Anzahl der CO_2-Molecüle den O-Atomen der zersetzten Körper entsprechen. Da nun in letzteren die O-Atome stets in Form von Carbonyl-

[1]) L. c.

(CO)-Gruppen vorhanden sind, so entspricht jedes Molecül CO_2 auch je einer Carbonylgruppe. Ebenso zeigt sich beim Vergleich der aus Xanthin erhaltenen Spaltungsproducte mit der Constitutionsformel des letzteren (siehe unten), dass das Mol. Ameisensäure aus der Methenyl(CH)-Gruppe des Xanthins entstanden ist.

Dementsprechend darf man folgern, dass das Molecül des Hypoxanthins 1 CO-Gruppe und 2 CH-Gruppen enthält. Der Beweis für das Vorhandensein einer CO-Gruppe ist durch die Ueberführung des Adenins in Hypoxanthin gegeben.

Den beiden letzten Folgerungen, dass Hypoxanthin 2 CH-, 2 NH- und 1 CO-Gruppe enthält, wird vollkommen Genüge gethan, wenn man sich Hypoxanthin aus Xanthin durch Umwandlung einer CO- in eine CH-Gruppe entstanden denkt. Das Xanthin enthält 2 Harnstoffreste; ersetzt man nun die Carbonylgruppe des einen oder des anderen durch eine Methenylgruppe, so nehmen sie folgende Gestalt an:

$$\text{aus } CO\left\langle\begin{matrix} NH \\ NH \end{matrix}\right. \quad \text{entsteht} \quad CH\left\langle\!\!\langle\begin{matrix} N \\ NH \end{matrix}\right. ,$$

$$\text{aus } CO\left\langle\begin{matrix} NH \\ N \end{matrix}\right. \quad \text{»} \quad CH\left\langle\!\!\langle\begin{matrix} N \\ N \end{matrix}\right. .$$

Bei dieser Umwandlung geht gleichzeitig eine vertretbare Imidgruppe verloren.

Die Uebereinstimmung der experimentell erhaltenen Resultate und der beim Vergleich des Hypoxanthins mit Xanthin und Harnsäure gemachten Schlussfolgerungen geben der Vermuthung, dass Hypoxanthin in der gedachten Weise aus Xanthin herzuleiten ist und dass es demnach dieselbe Gruppirung der C- und N-Atome, wie Xanthin und Harnsäure enthält, grosse Wahrscheinlichkeit.

Weitere Gründe für die Richtigkeit dieser Ansicht ergeben sich aus folgender Betrachtung.

Nach dem Auftreten des Alloxans bei der Oxydation des Bromadenins und Bromhypoxanthins mit Salzsäure und chlorsaurem Kali muss im Adenin und Hypoxanthin die

folgende ringförmige Bindung zwischen 2 N- und 3 C-Atomen angenommen werden:

```
       N — C
     ´     |
C <        C
     `     |
       N — C
```

Um das Skelett des Hypoxanthin-Molecüles zu erhalten, bleibt nur noch die Vertheilung von 2 N- und 1 C-Atom übrig.

Die ausserordentliche Beständigkeit des Adenins wie Hypoxanthins gegen oxydirende Mittel, wie Kaliumpermanganat, chlorsaures Kali, welche die des Xanthins und der Harnsäure gegenüber den gleichen Reagentien bei Weitem übertrifft, schliesst die Bindung der genannten Atome an den Alloxankern in Form offener Seitenketten vollständig aus. Sie müssen vielmehr ebenso wie bei der Harnsäure und bei dem Xanthin mit den C-Atomen des Alloxankerns ringförmig verbunden sein.

Für die gegenseitige Bindung der beiden N- und des einen C-Atomes sind die beiden folgenden Fälle möglich:

1. N — N — C, 2. N — C — N.

Wäre das Erste der Fall, so müsste bei der Spaltung des Hypoxanthins durch Salzsäure entweder die Bindung zwischen den beiden N-Atomen erhalten bleiben, oder es müsste an das eine N-Atom Wasserstoff, an das 2. N-Atom eine Hydroxylgruppe sich anlagern und so Hydroxylamin entstehen, welches sich weiter in Ammoniak, Stickstoff und Stickoxyd zersetzen würde. Beide Möglichkeiten sind auf Grund der experimentell festgestellten Spaltung, wie sie obige Gleichung angibt, ausgeschlossen, d. h. eine Bindung zwischen 2 N-Atomen kann überhaupt nicht im Mol. des Adenins und Hypoxanthins vorhanden sein.

Es bleibt nur noch übrig, festzustellen, mit welchen von den 3 benachbarten C-Atomen des Alloxankerns die beiden N-Atome der Gruppe N — C — N verbunden sind, ob mit einem, mit 2 benachbarten oder den beiden endständigen C-Atomen.

Hierüber gibt das Auftreten des Glycocolls unter den Spaltungsproducten bei Einwirkung von Salzsäure Aufschluss.

Die Art und Weise der Zersetzung der Harnsäure und des Xanthins durch Salzsäure wird am Besten durch Vergleichung der Spaltungsproducte mit den Constitutionsformeln der Körper klar.

$$
CO\begin{array}{l} NH - CO \\ \quad\quad\;\; | \\ \quad\quad\;\; C - NH \\ \quad\quad\;\; \| \\ NH - C - NH \end{array}\!\!\!>CO + 5\,H_2O = CO_2 \quad \begin{array}{ll} NH_3 & COOH \\ & \;| \\ & CH_2 - NH_2 \\ NH_3 & CO_2 \quad NH_3 \end{array} CO_2
$$

Harnsäure.

$$
CO\begin{array}{l} NH - CH \\ \quad\quad\;\; \| \\ \quad\quad\;\; C - NH \\ \quad\quad\;\; | \\ NH - C - N \end{array}\!\!\!\diagdown CO + 6\,H_2O = CO_2 \quad \begin{array}{ll} NH_3 & H.COOH \\ & CH_2 - NH_2 \\ & \;| \\ NH_3 & COOH \; NH_3 \end{array} CO_2
$$

Xanthin.

Die unter Aufnahme von Wasser erfolgende Spaltung verläuft in der Weise:

1. Die einfache Bindung zwischen zwei C-Atomen bleibt bestehen;

2. die doppelte Bindung zwischen 2 C-Atomen wird gelöst, indem H_2 an das eine, O an das andere C-Atom tritt;

3. die einfachen und doppelten Bindungen zwischen C- und N-Atomen werden gelöst; es tritt H, resp. H_2 an das N-Atom, OH, resp. O an das C-Atom.

4. Nur in einem Falle bleibt eine einfache Bindung zwischen C und N bestehen, wie das Auftreten von Glycocoll bei der Spaltung beweist.

Die Entstehung dieses Körpers setzt im Mol. der Harnsäure und des Xanthins zunächst ein C-Atom voraus, welches mit einem N- und einem C-Atom durch einfache Bindung in Zusammenhang steht. Ferner muss aber das mit dem N verbundene C-Atom auch noch mit einem 2. C-Atom durch doppelte Bindung vereinigt sein, um eine Anlagerung von 2 H-Atomen, wie es für die Bildung des Glycocolls erforderlich ist, zu ermöglichen.

Die Entstehung des Glycocolls ist also an das Vorhandensein folgenden Atomcomplexes gebunden,

```
C — C = C,
    |
    N
```

welcher in der That im Mol. der Harnsäure und des Xanthins vorhanden ist und im Mol. des Hypoxanthins nicht fehlen darf.

Die 3 C-Atome des genannten Atomcomplexes müssen mit den 3 benachbarten C-Atomen des Alloxankernes identisch sein, so dass in Verbindung mit dem vorher Gesagten folgende Atomgruppe im Hypoxanthin angenommen werden muss:

```
     N — C
    /    ||
C <      C N — C — N.
    \    |
     N — C
```

Das mittlere C-Atom des Mesoxalsäurerestes (C = C — C) ist gesättigt, und es kann daher das endtsändige N-Atom der Seitenkette N — C — N nur noch mit einem der beiden äusseren C-Atome verbunden sein. Berücksichtigt man nun, dass Adenin und Hypoxanthin ebenso wie Guanin und Xanthin Monobromderivate liefern, so wird man annehmen können, dass bei allen 4 Körpern auch dieselbe Methenylgruppe vorhanden ist, durch deren Anwesenheit die Bildung der genannten Derivate bedingt ist. Das endständige N-Atom der Seitenkette muss alsdann mit dem unteren C-Atom des Mesoxalsäurekernes verbunden sein:

```
     N — CH
    /    ||
C <      C — N
    \    |      \
     N — C — N  /  C.
```

Auch diese Auseinandersetzung hat daher die oben ausgesprochene Ansicht von der Identität der Gruppirung der C- und N-Atome im Hypoxanthin und Xanthin bestätigt. Führt man jetzt die Vertheilung der zur Vervollständigung der Constitutionsformel des Hypoxanthins noch fehlenden H- und O-Atome aus unter Berücksichtigung der Thatsache, dass 2 Imidgruppen und 1 CO-Gruppe vorhanden sein müssen, so ergibt sich mit Evidenz, dass Hypoxanthin aus dem Xanthin

nur durch Umwandlung einer CO- in eine CH-Gruppe entstanden ist.

Xanthin enthält 2 CO-Gruppen; je nachdem man nun die eine oder die andere durch eine CH-Gruppe ersetzt, ergeben sich 3 Formeln für Hypoxanthin:

1.

$$\begin{array}{llcll} & NH & - & CH & & \\ CH\Big< & & & \| & & \\ & & & C & - NH \searrow & \\ & & & | & & CO \\ & N & - & C & = N \nearrow & \end{array}$$

2.

$$\begin{array}{llcll} & N & - & CH & & \\ CH\Big< & & & \| & & \\ & & & C & - NH \searrow & \\ & & & | & & CO \\ & NH & - & C & = N \nearrow & \end{array}$$

3.

$$\begin{array}{llcll} & NH & - & CH & & \\ CO\Big< & & & \| & & \\ & & & C & - N \searrow & \\ & & & | & & CH \\ & NH & - & C & = N \nearrow & \end{array}$$

Durch die Stellung der CO-Gruppen ist gleichzeitig die der einen CH-Gruppe und der NH-Gruppen gegeben. Formel 1 und 2 enthalten je eine NH-Gruppe im Alloxankern und Harnstoffkern, Formel 3 enthält beide NH-Gruppen im Alloxankern.

Um die wirkliche Stellung der NH-Gruppe im Hypoxanthin zu ermitteln, hat man nur nöthig, in letzteres 2 Methylgruppen einzuführen und das so erhaltene Dimethylhypoxanthin der Oxydation mit Salzsäure und chlorsaurem Kali zu unterwerfen.

Leitet sich das Dimethylhypoxanthin von der Formel 1 oder 2 ab, so müssten bei der Oxydation Monomethylalloxan und Monomethylharnstoff entstehen, ist es dagegen ein Derivat von Formel 3, so würden Dimethylalloxan und Harnstoff erhalten werden müssen.

Da jedoch die Ausbeute an Alloxan bei der Oxydation des Bromadenins und Bromhypoxanthins nur eine geringe war, so wurde von der Ausführung dieser Oxydation beim Dimethylhypoxanthin Abstand genommen, zumal die Spaltung desselben durch Salzsäure, welche Operation nur geringe Mengen an Substanz erfordert, die Frage in gleicher Weise beantworten musste.

Die beiden C-Atome und das eine N-Atom, welche bei der Behandlung mit conc. Salzsäure als Glycocoll abgespalten werden müssen, sind in den 3 Formeln durch starken Druck gekennzeichnet. In den beiden ersten Formeln ist dasselbe N-Atom gleichzeitig mit einem durch Alkyle vertretbaren H-Atom verbunden. Das von diesen sich ableitende Dimethylhypoxanthin wird daher bei der Spaltung durch Salzsäure die eine Methylgruppe in Form von Methylamin, die 2. als Glycocoll abspalten, während aus dem Dimethylhypoxanthin nach Formel 3 Methylamin (2 Mol.) und Glycocoll entstehen wird.

Die Spaltung des Dimethylhypoxanthins, bei welcher Methylamin und Methylglycocoll erhalten wurde, hat man zu Gunsten der beiden ersten Formeln entschieden, zwischen denen eine engere Wahl zu treffen nicht gelungen ist, da das Dimethylhypoxanthin, gleichgiltig ob es sich von Formel 1 oder 2 ableitet, sowohl bei der Spaltung durch Salzsäure, als auch bei der Oxydation mit chlorsaurem Kali dieselben Producte geben muss. Uebrigens zeigen beide Formeln nur eine geringe Verschiedenheit; die bisherigen Resultate lassen nur noch zweifelhaft, welches der beiden N-Atome des Alloxankerns mit der Methenylgruppe zweifach verbunden ist.

Nehmen wir eine der beiden Formeln, etwa 1, als die dem Hypoxanthin zukommende an, so sind die Constitutionsformeln des Adenins, Hypoxanthins und ihrer Derivate folgende:

```
      NH — CH                          NH — CH
     /     ||                         /     ||
CH <       C — NH                CH <       C — NH
    \\      |     >CO                \\      |     >C(NH)
      N —— C = N                       N —— C = N
   Hypoxanthin.                          Adenin.
```

Da Methyladenin die Methylgruppe in Form von Methylamin abspaltet, muss es die CH_3-Gruppe im Alloxankern enthalten.

```
      NCH3 — CH                         NCH3 — CH
     /       ||                        /       ||
CH <         C — NH               CH <         C — NCH3
    \\        |     >C(NH)             \\        |       > CO
      N ——— C = N                       N ——— C = N
    Methyladenin.                     Dimethylhypoxanthin.
```

Entsprechend dem Bromxanthin, Bromguanin kommen dem Bromadenin und Bromhypoxanthin die folgenden Formeln zu:

```
       NH — CBr                     NH — CBr
            |                      /     |
CH          C — NH         CH  <         C — NH
   \        |      >  CO           \     |       > C(NH)
    N  —    C = N                   N —  C = N
```

Bromhypoxanthin. Bromadenin.

Das Wasserstoffatom der 2. CH-Gruppe durch Brom zu ersetzen, ist mir nicht gelungen; Brom wirkt auf freies Bromadenin selbst über 100° nicht substituirend ein.

Von den 2 doppelten Bindungen, welche im Molecül des Hydroxycaffeïns vorkommen, wird nur die eine nach den Untersuchungen E. Fischer's (l. c.) durch Anlagerung von Brom in eine einfache verwandelt; eine Anlagerung von 4 Atomen Brom, wie sie beim Bromadenin und Bromhypoxanthin vorkommen, ist beim Hydroxycaffeïn nicht bemerkt worden. Hiernach scheint die doppelte Bindung zwischen dem N-Atom des Harnstoffkerns und dem C-Atom des Alloxankerns nicht durch Aufnahme von Brom vereinfacht werden zu können, nimmt man dasselbe beim Adenin und Hypoxanthin an, so können den Tetrabromiden ihrer Bromderivate nur die folgenden Formeln zukommen:

```
          NH — CBr₂
        /       |  / Br
CHBr  <         C —— NH
        \       |         >  CO.HBr.
          NBr — C — N
```

Bromhydrat des Bromhypoxanthin-Tetrabromides.

Vielleicht findet auch eine Umlagerung zwischen einem H- und einem Brom-Atom statt.

```
          NH — CBr₂
        /       |  / Br
CBr₂  <         C —— NH
        \       |         >  CO.HBr.
          NH —  C — N
```

Beide Formeln für Adenin und Hypoxanthin, zwischen denen noch eine engere Wahl zu treffen ist, genügen allen auf experimentellem Wege ermittelten Eigenschaften der Basen und erklären in ungezwungener Weise die Art und Weise der Zersetzung durch Salzsäure und der Oxydation mit chlorsaurem Kali. Sie erhalten 2 vertretbare Imidgruppen, 2 CH- und 1 CO-, resp. C(NH)-Gruppe.

Die Entstehung von Bromsubstitutions- und Bromadditionsproducten wird ebenso leicht wie beim Xanthin und dessen Homologen veranschaulicht. Die Spaltung des Adenins und Hypoxanthins und ihrer Homologen durch Salzsäure muss nach den obigen Formeln so verlaufen, wie es der Versuch ergeben hat. Vor Allem geben die Formeln eine gute Erklärung dafür, dass bei der Oxydation des Bromadenins und Bromhypoxanthins nur geringe Mengen Alloxan erhalten wurden. An der Stelle der doppelten Bindung zwischen der CH-Gruppe und dem N-Atom muss es nämlich leicht durch Aufnahme der Bestandtheile des Wassers zu einer Sprengung des Alloxankerns kommen, so dass die Entstehung von Alloxan oder Parabansäure nur eine beschränkte sein kann. Viel eher wird eine vollständige Oxydation des Alloxankernes bis zu Kohlensäure und Oxalsäure, welch' letztere ja auch bei der Oxydation des Bromadenins nachgewiesen wurde, erfolgen.

Da die Stelle der leichten Spaltbarkeit des Alloxankerns sich im Harnstoffkern desselben befindet, so kann die verhältnissmässig grosse Menge an Harnstoff, welche bei der Oxydation des Bromadenins und Bromhypoxanthins erhalten wurde, nicht von einer Zersetzung des Alloxankerns herrühren; es muss vielmehr neben dem letzteren noch ein Harnstoffkern angenommen werden.

Weiteren Versuchen soll es vorbehalten bleiben, festzustellen, ob zwischen den Formeln 1 und 2 für Hypoxanthin noch eine engere Wahl getroffen werden kann. W. von Mach[1]) hat festgestellt, dass nach Verfütterung von Hypoxanthin die Harnsäureausscheidung bei Hühnern vermehrt wird; Adenin

[1]) Arch. f. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 23, S. 148.

und Xanthin werden sich vermuthlich ähnlich verhalten. Werden diese Körper durch Oxydation ohne vorherige Spaltung in Harnsäure übergeführt, so darf man erwarten, nach Verfütterung der Methylderivate der genannten Basen zu entsprechend methylirten Harnsäuren zu kommen. Wird also nach Verfütterung von Methyladenin und Dimethylhypoxanthin Monomethyl-, resp. Dimethylharnsäure ausgeschieden und findet bei dieser Umwandlung keine Veränderung der Stellung der Methylgruppen statt, was durch Controllversuche mit Caffeïn, Theobromin, Theophyllin festgestellt werden soll, so würde es sich nur noch um die Bestimmung der Lage der Methylgruppen in den erhaltenen homologen Harnsäuren handeln, um die Constitution des Adenins und Hypoxanthins endgiltig angeben zu können. Die Ausführung dieser Bestimmung kann bei der Reactionsfähigkeit der Harnsäure und ihrer Homologen nicht schwierig sein. Die im Vorhergehenden angedeuteten Versuche anzustellen möchte ich mir vorbehalten.

Zum Schluss möchte ich mir noch eine Bemerkung darüber erlauben, ob mit der Entdeckung des Adenins die Reihe der sog. Xanthinbasen abgeschlossen ist. Es ist möglich, dass ebenso wie Hypoxanthin aus Xanthin, so auch aus Hypoxanthin durch Umwandlung der CO- in eine CH-Gruppe eine neue Base $C_5H_4N_4$, welche mit dem von Kossel Adenyl genannten Radical isomer ist, entsteht. Diese Base kann ihrer Ableitung nach nur folgende Constitution haben:

```
     NH — CH                        N —— CH
    /      |                       /      ||
CH <       C — N         oder  CH <       C — N
    \\     |      > CH             \\     |      > CH
     N —— C = N                     NH — C = N
```

Sie enthält nur noch CH-Gruppen, keine CO-Gruppen mehr, ferner enthält sie nur noch eine substituirbare Imidgruppe. Sie wird ebenso wie Xanthin und Hypoxanthin ein Monobromderivat und wahrscheinlich ein Hexabromadditionsproduct liefern müssen. Bei der Spaltung durch Salzsäure muss sie nach folgender Gleichung zersetzt werden.

$$C_5H_4N_4 + 8\,H_2O = 3\,NH_3 + NH_2.CH_2.COOH + 3\,H.COOH.$$

Zur Chemie der Leucocyten[1]).

Von

Leon Lilienfeld.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 23. September 1893.)

Eine eingehende Untersuchung über die Zusammensetzung der Leucocyten fehlt bis jetzt und die spärlichen Kenntnisse, welche wir darüber besitzen, wurden theils durch Analogieschlüsse, zu welchen die Untersuchungen Hoppe-Seyler's[2]) über die Eiterzellen berechtigen, theils durch vereinzelte mikrochemische Beobachtungen erworben.

Hoppe-Seyler[3]) hat auch Glykogen in den Leucocyten nachgewiesen, indem er Rindslinsen in die Bauchhöhle eines Hundes einführte und in dem mit eingewanderten Leucocyten durchsetzten Gewebe einen grossen Glykogenreichthum fand.

Schliesslich hat A. Kossel[4]) die Zusammensetzung des leukämischen Blutes für eine wichtige Schlussfolgerung in dieser Frage verwerthet; indem er im leukämischen Blute mehr als die Hälfte der gesammten Phosphorsäure als an Eiweiss gebunden erkannte und darin auch die Nucleïnbasen auffand, bewies er auf indirectem Wege, dass die Leucocyten Substanzen aus der Gruppe der Nucleoproteïde enthalten müssen.

Die Chemie der Leucocyten ist bis vor Kurzem blos an Material studirt worden, welches aus eiskaltem filtrirtem Pferdeblutplasma nach Alexander Schmidt's Methode

---

1) Vorläufige Mittheilungen: Leon Lilienfeld: Ueber Leucocyten und Blutgerinnung. Derselbe: Ueber den flüssigen Zustand des Blutes und die Blutgerinnung. Verhandlungen der physiologischen Gesellschaft zu Berlin vom 8. April und 22. Juli 1892.

2) Hoppe-Seyler, Med.-chem. Untersuch., Berlin 1870.

3) Hoppe-Seyler, Med.-chem. Untersuch., S. 441, Berlin 1871.

4) Kossel, diese Zeitschrift, Bd. 7, S. 7.

dargestellt worden ist. Abgesehen von der grossen Schwierigkeit in der Beschaffung derartigen Ausgangsmaterials krankt diese Methode an dem ausserordentlich grossen Fehler, dass durch die Verdünnung des Plasmas mit dem 60- bis 80fachen Volumen Wassers der grösste Theil der in Wasser löslichen Substanzen, die, wie ich zeigen werde, die Hauptmasse der Leucocyten ausmachen, verloren geht.

Um über die eigentlichen primären gewebsbildenden Substanzen der Leucocyten zu einiger Orientirung zu gelangen, habe ich mir die Aufgabe gestellt, die Lymphocyten aus Lymphdrüsen und der Thymusdrüse in möglichst grosser Reinheit zu isoliren. Zu diesem Zwecke wurden die aus dem Schlachthause kommenden Drüsen von den Blutgefässen und dem anhängenden Fett sorgfältig befreit, in kleine Stücke geschnitten und in Colirtücher aus grobmaschigem festen Hanf geschlagen, nachher wurden die ganzen Massen in einer Presse stark gepresst und der abfliessende Saft centrifugirt. Hierbei muss sorgfältig die Gegenwart von Wasser vermieden werden. Der Saft, welcher sich mikroskopisch als ein farbloses Serum mit darin suspendirten vollständig gut erhaltenen Lymphocyten darstellt, wird durch die Centrifuge in eine weisse Bodenschicht und eine darüber stehende Flüssigkeit zerlegt. Die Flüssigkeit wird abgegossen und, nachdem das Mikroskop gelehrt, dass der Bodensatz nur aus Lymphocyten besteht, derselbe in Arbeit genommen.

Die Lymphocyten der Thymusdrüse des Kalbes sind meistens einkernige Zellen, in denen die Masse des Kerns diejenige des Cytoplasmas überragt. Unter dem Mikroskop sind sie ganz rund, gar nicht gequollen, bei Verarbeitung von frischen Drüsen ohne eine Spur von Zerfall.

a) Die Eiweisskörper des Cytoplasmas.

Im Wasserextract der Leucocyten lassen sich zwei Eiweisskörper nachweisen:

1. Ein Eiweissstoff, der bei der Temperatur von 73 bis 75 Grad C. gerinnt;
2. ein bei 48 Grad coagulirender Eiweissstoff.

Ausserdem kann man aus dem Cytoplasma auch ein Nucleoproteïd gewinnen, indem man die Leucocyten mit einer 10proc. Kochsalzlösung extrahirt und das Kochsalzextract mit Wasser fällt[1]). Dieses Nucleoproteïd ist in seinen Eigenschaften dem Ichthulin[2]) sehr ähnlich, es ist löslich in verdünnten Säuren und Alkalien, unlöslich in Wasser. Löst man diese Substanz, frisch gefällt, in 0,1—0,3proc. Salzsäure und unterwirft sie der Einwirkung künstlichen Magensaftes bei Körpertemperatur, so entsteht ein Niederschlag, welcher in verdünnten Säuren unlöslich, in caustischen und kohlensauren Alkalien leicht löslich ist. Mit Soda und Salpeter verascht gibt er reichliche Phosphorreaction. Darnach ist die Auffassung dieser Substanz als Nucleoproteïd gerechtfertigt.

Nach Erschöpfung des ursprünglichen Nucleoproteïds mit warmem Alkohol, kaltem absolutem Alkohol und Aether wurde diese Substanz im Vacuum über H_2SO_4 getrocknet, nachher bei 110 Grad zur Gewichtsconstanz gebracht und einer Analyse unterzogen.

Folgende Werthe resultirten:

C- und H-Bestimmung:

0,2371 gr. Substanz gaben 0,4648 gr. CO_2 = **53.46** % C.
0,1632 gr. H_2O = **7,64** % H.

N-Bestimmung (nach Kjeldahl):

0,2575 gr. trockene Substanz verbrauchten zur Neutralisation des alkalischen Destillats 28,65 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure = **15,57** % N.

P-Bestimmung:

3,2744 gr. trockene Substanz gaben 0,0512 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **0,433** % P.

b) Das Alkoholextract.

Kocht man die Leucocyten längere Zeit mit 50proc. Alkohol, so gehen ziemlich bedeutende Mengen von Bestandtheilen in Lösung über. Der Alkohol färbt sich braun. Filtrirt man nun ab und lässt das Filtrat eine Nacht lang in der Kälte stehen, so scheiden sich ziemlich grosse Mengen

[1]) Halliburton: Lehrbuch der chemischen Physiologie und Pathologie, Heidelberg 1893, S. 274.

[2]) Siehe Walter: Diese Zeitschrift, Bd. XVI, S. 335.

einer krystallinischen Substanz ab. Durch mehrfaches Umkrystallisiren aus warmem Alkohol gereinigt erwies sich diese Substanz als Protagon. Wenn man nämlich diese Substanz — nach der Methode von Kossel und Freytag[1]) — in Methylalkohol löst und die Lösung auf dem Wasserbade mit einer Lösung von Baryumhydrat in Methylalkohol versetzt, so bildet sich ein voluminöser Niederschlag. Derselbe wird mit barythaltigem Methylalkohol ausgewaschen, in Wasser fein zertheilt und mit einem Strom von Kohlensäure längere Zeit behandelt. Der nun entstehende Niederschlag wird auf einem Filter gesammelt und sodann bei 50 Grad mit absolutem Alkohol ausgezogen. Aus dem Alkohol krystallisiren nun bei Zimmertemperatur die für das Protagon characteristischen Cerebroside aus. Sie stellen ein weisses krystallinisches Pulver vor, welches mit verdünnter Schwefelsäure erhitzt eine Kupferoxyd in alkalischer Lösung reducirende Zuckerart (Galactose) liefert. Ob hierbei ein oder mehrere Cerebroside entstehen, habe ich nicht näher untersucht. Da ich nun ausserdem eine Phosphorbestimmung in der ursprünglichen Substanz ausführte und die Zahl 1,13 fand, fühle ich mich berechtigt, diese Substanz mit Sicherheit als Protagon anzusprechen.

Der nach dem Abfiltriren des Protagons bleibende Alkohol wurde nun auf ein kleines Volumen abdestillirt und dann auf dem Wasserbade bis zur syrupösen Consistenz eingeengt, der Syrup in heisses Wasser gegossen, hierbei geht eine grosse Menge der Bestandtheile in Lösung. Wenn man nun die wässerige Lösung, nachdem sie von den schleimigen ungelösten Bestandtheilen abfiltrirt worden ist, eindunstet, so bekommt man schliesslich einen Syrup, der beim Erkalten zu einer festen Krystallmasse erstarrt. Kocht man diese längere Zeit mit absolutem Alkohol aus, filtrirt ab und lässt den Alkohol erkalten, so krystallisirt aus demselben in schönen atlasglänzenden Blättchen eine Substanz aus, welche sich nach mehrfachem Umkrystallisiren aus 90 proc. Alkohol als Amidovaleriansäure erwies.

---

[1]) Diese Zeitschrift, Bd. XVII, S. 440.

Die Analyse ergab:

1. 0,1817 gr. Substanz gaben $\begin{cases} 0{,}3454 \text{ gr. } CO_2, \\ 0{,}1583 \text{ gr. } H_2O. \end{cases}$
2. 0,1879 gr. Substanz verbrauchten zur Neutralisation des alkalischen Destillats 15,1 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure.

Berechnet für die Formel $C_5H_{11}NO_2$:	Gefunden:
C = 51,28 %.	C = 51,84 %.
H = 9,40 %.	H = 9,68 %.
N = 11,96 %.	N = 11,2 %.

Das Präparat war nicht ganz rein, was die nicht ganz genaue Uebereinstimmung des gefundenen Stickstoffprocentgehaltes mit dem berechneten zur Folge hatte.

Der mit Alkohol erschöpfte Rückstand wird nun wieder im Wasser gelöst und mit basisch essigsaurem Blei gefällt. Der voluminöse Bleiniederschlag wird auf einem Filter gesammelt und mehrere Male mit Wasser ausgewaschen, nachher in Wasser fein vertheilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Schwefelblei abfiltrirte Flüssigkeit wird auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen gebracht und mit heissem Alkohol bis zur schwachen Trübung versetzt. Nach längerem Stehen scheidet sich eine grosse Menge schön ausgebildeter Krystalle aus. Die Krystallmasse durch mehrfaches Umkrystallisiren aus wässerigem Alkohol gereinigt, schmilzt bei 225 Grad und erstarrt beim Erkalten zu feinen Nadeln. Die ausgeführte Elementaranalyse ergab Zahlen, welche die Identität des Körpers mit Inosit sicherstellten.

C- und H-Bestimmung.

0,2653 gr. Substanz gaben $\begin{cases} 0{,}3887 \text{ gr. } CO_2 = \mathbf{39{,}96}\,\%\ C, \\ 0{,}1653 \text{ gr. } H_2O = \mathbf{6{,}92}\,\%\ H. \end{cases}$

Berechnet für $C_6H_{12}O_6$:	Gefunden:
40,00 % C.	39,96 % C.
6,66 % H.	6,92 % H.

Das auf diese Weise erhaltene Inosit ist krystallwasserfrei und gibt die S c h e r e r'sche und S e i d e l'sche Reaction.

Ausser Protagon und Inosit gelang es mir, auch noch im Alkoholextract der Leucocyten Monokaliumphosphat nachzuweisen, worauf ich in einer anderen Abhandlung zurückzukommen gedenke.

Dass in dem Alkoholextract auch Lecithin und Cholesterin vorhanden sind, ergibt sich aus der später folgenden quantitativen Analyse der Leucocyten.

c) Der Zellkern der Leucocyten und das Nucleohiston.

Schüttelt man die Leucocyten oder die ganz fein zerhackten Thymusdrüsen mit Wasser, so geht ein Körper in Lösung, welcher die Hauptmasse des Leucocytenkernes ausmacht. Es ist dies das schon früher von mir[1]) beschriebene Nucleohiston; dasselbe wird folgendermaassen dargestellt. Das Wasserextract der Leucocyten oder der ganzen Drüsen wird colirt und die Flüssigkeit centrifugirt. Von dem hierbei entstehenden kleinen Bodensatz wird die Flüssigkeit abgegossen und filtrirt. Aus dem nun resultirenden, von zelligen Elementen völlig freien Wasserextract wird das Nucleohiston mit Essigsäure ausgefällt, auf einem Filter gesammelt, mit Wasser fein zerrieben, durch Zusatz von ein wenig Natriumcarbonat bis zur ganz schwach alkalischen Reaction gelöst, filtrirt und durch Essigsäure wieder gefällt. Nochmals durch Lösen und Fällen in derselben Weise gereinigt wird der Körper für die Elementaranalyse mit essigsäurehaltigem Wasser, Weingeist, kaltem absolutem Alkohol behandelt, welcher mit heissem absolutem Alkohol drei- bis viermal am Rückflusskühler ausgekocht und schliesslich mit Aether vollends erschöpft. Die ganz weisse Masse wurde mit dem Spatel in kleine Stücke zerbröckelt und unter der Luftpumpe getrocknet. Nach Abdunsten des Aethers stellt das Nucleohiston ein schneeweisses, äusserst zartes Pulver dar, welches sich bei 110 bis 115 Grad leicht bis zur Gewichtsconstanz trocknen lässt.

Die Eigenschaften des Nucleohistons sind folgende. Es ist unlöslich in Benzol, Alkohol, Chloroform, Methylalkohol und Aether, unlöslich in Essigsäure, dagegen löslich in Eisessig, concentrirter Salz- und Salpetersäure. Es ist ferner löslich in Natroncarbonat, Natriumhydrat, Ammoniak und frisch gefällt in Kochsalz und Magnesiumsulphat, besonders bei Gegenwart

---

[1]) Leon Lilienfeld: Ueber Leucocyten und Blutgerinnung; derselbe: Ueber den flüssigen Zustand und die Blutgerinnung. Verhandlungen der Physiologischen Gesellschaft zu Berlin vom 8. April und 22. Juli 1892

von etwas Essigsäure. Aus der neutralen Lösung des Nucleohistons fällt es durch Essigsäure, Mineralsäure (im Ueberschuss löslich), Alkohol, Platinchlorid, Silbernitrat, Quecksilberchlorid. Durch Sättigung mit $MgSO_4$ ist es nicht fällbar. Die Elementaranalyse des Nucleohistons ergab:

C- und H-Bestimmung:

Präparat 1.

0,2242 gr. trockene Substanz gaben { 0,3969 gr. CO_2 = **48,28** % C, 0,1454 gr. H_2O = **7,21** % H.

Präparat 2.

a) 0,2012 gr. trockene Substanz gaben 0,3549 gr. CO_2 = **48,11** % C (die Wasserstoffbestimmung ist verunglückt).

b) 0,2468 gr. trockene Substanz gaben { 0,4360 gr. CO_2 = **48,18** % C, 0,1532 gr. H_2O = **6,89** % H.

Präparat 3.

a) 0,2468 gr. trockene Substanz gaben { 0,4417 gr. CO_2 = **48,77** % C. 0,1524 gr. H_2O = **6,86** % H.

b) 0,1938 gr. trockene Substanz gaben { 0,3448 gr. CO_2 = **48,54** % C. 0,1195 gr. H_2O = **6,85** % H.

Präparat 4.

0,2239 gr. trockene Substanz gaben { 0,4021 gr. CO_2 = **48,98** % C. 0,1450 gr. H_2O = **7,19** % H.

N-Bestimmungen:

Präparat 1.

a) Nach Dumas: 0,2647 gr. trockene Substanz gaben bei Bar. 740 mm., t. 17,90, Vol. = 40 cbcm. = **16,99** % N.

b) Nach Kjeldahl: 0,2357 gr. trockene Substanz wurden mit conc. Schwefelsäure und Permanganat verascht. Zur Neutralisation des alkalischen Destillats wurden verbraucht 28,23 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure = **16,77** % N.

c) Nach Kjeldahl: 0,2525 gr. trockene Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 30,45 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure = **16,88** % N,

Präparat 2 (nach Kjeldahl).

a) 0,3355 gr. trockene Substanz verbrauchten 40,6 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure = **16,94** % N.

b) 0,2596 gr. trockene Substanz verbrauchten 31,18 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure = **16,82** % N.

c) 0,2763 gr. trockene Substanz verbrauchten 33,2 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure = **16,82** % N.

Präparat 3.

0,3005 gr. trockene Substanz verbrauchten 36,15 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure = **16,84** % N.

Präparat 4 (nach Kjeldahl).

a) 0,3213 gr. trockene Substanz verbrauchten 38,9 cbcm. $^{1}/_{10}$ N-Oxalsäure = **16,95** % H.

b) 0,2761 gr. trockene Substanz verbrauchten 33,1 cbcm. $^{1}/_{10}$ N-Oxalsäure = **16,78** % N.

Die Veraschung grösserer Substanzmengen zum Zwecke der Bestimmungen von Schwefel und Phosphor wurde in der Weise ausgeführt, dass die Substanz mit Soda und Salpeter vollständig verbrannt wurde.

P-Bestimmungen:

Präparat 1.

a) 0,4165 gr. trockene Substanz gaben 0,0465 gr. Magnesiumpyrophosphat = **3,02** % P.

b) 0,5245 gr. trockene Substanz gaben 0,0580 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **3,088** % P.

Präparat 2.

a) 0,3765 gr. trockene Substanz gaben 0,0407 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **3,02** % P.

b) 0,4845 gr. trockene Substanz gaben 0,0516 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **2,974** % P.

Präparat 3.

a) 0,4846 gr. trockene Substanz gaben 0,0521 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **3,00** % P.

b) 0,4983 gr. trockene Substanz gaben 0,0548 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **3,071** % P.

Präparat 4.

0,6132 gr. trockene Substanz gaben 0,0659 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **3,00** % P.

S-Bestimmungen:

Präparat 1.

0,2713 gr. trockene Substanz mit Soda und Salpeter verascht, Schmelze in Wasser, gelöst, mit Salzsäure bis zur sauren Reaction versetzt und mit überschüssiger Salzsäure dreimal zur Trockne verdunstet 14,4 mgr. Baryumsulfat = **0,752** % Schwefel.

Präparat 2.

0,3963 gr. trockene Substanz gaben 0,0188 gr. $BaSO_4$ = **0,653** % Schwefel.

Im Mittel resultiren diese Zahlen:

C = 48,46 %.
H = 7,00 %.
N = 16,86 %.
P = 3,025 %.
S = 0,701 %.

Diese ausserordentlich gut übereinstimmenden Elementaranalysenzahlen einerseits und andererseits der Umstand, dass das erste Präparat, trotzdem es durch Lösen in Natroncarbonat und nachheriges Fällen nicht gereinigt wurde, in seiner Elementarzusammensetzung gut mit den anderen über-

einstimmt, liefern den werthvollen Beweis, dass das Nucleohiston ein chemisches Individuum ist.

Nach seinem Phosphorgehalt und seinen Löslichkeitsverhältnissen differirt das Nucleohiston sowohl von den bisher bekannten Nucleoalbuminen als von den Nucleïnen, um so mehr als es als Spaltungsproduct ein typisches Nucleïn liefert.

Behandelt man das Nucleohiston längere Zeit mit künstlichem Magensaft bei Körpertemperatur, so liefert es als Endproduct ein Nucleïn, während Eiweisskörper als Peptone in Lösung gehen.

In diesem Nucleïn wurde, nachdem es mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen wurde, der Phosphorgehalt bestimmt.

Präparat 1.

0,2510 gr. trockene Substanz mit Soda und Salpeter verascht, Schmelze in Wasser gelöst und mit HCl mehrere Male eingedunstet, dann mit Magnesiamixtur versetzt, gaben 0,0446 gr. $Mg_2P_2O_7$ = 4,988 % P.

Präparat 2.

0,2829 gr. trockene Substanz gaben, mit rauchender Salpetersäure nach Carius 5 Stunden auf 210 Grad erwärmt und nach dem Verdunsten der Salpetersäure in Wasser gelöst und mit Magnesiamixtur gefällt, 0,0506 gr. $Mg_2P_2O_7$ = 4,995 % P.

Im Mittel 4,991 % P.

Ein Nucleïn mit demselben Phosphorgehalt bekommt man aus dem Nucleohiston durch Behandeln desselben mit 0,8proc. Salzsäure. Dann geht die eine Componente, das Histon, in Lösung, während das Nucleïn ungelöst bleibt. Dieses Nucleïn unterscheidet sich jedoch von dem mit dr Verdauungsmethode erhaltenen durch seine Löslichkeit in überschüssiger Salzsäure.

Ein durch Salzsäure von Histon vollständig befreites Präparat wurde auf seinen Phosphorgehalt geprüft, es gaben 0,5268 gr. trockene Substanz 0,0887 gr. $Mg_2P_2O_7$ = 4,702 % P.

Daraus ergibt sich, dass das durch die Verdauung und das durch Salzsäure erhaltene Nucleïn sehr nahe verwandte Präparate sind.

Ich will hier gleich bemerken, dass man aus dem Nucleohiston durch Behandlung desselben mit siedendem Wasser noch ein Nucleïn bekommen kann, welches sowohl in Wasser als in wässerigem Alkohol und sogar in verdünnten Mineral-

Das Histon ist ein Eiweisskörper, welcher ausgesprochene basische Eigenschaften hat, was daraus erhellt, dass er mit Salzsäure eine in Wasser leicht lösliche Verbindung eingeht. Das Histon der Leucocyten unterscheidet sich von dem der Vogelblutkörperchen darin, dass es in der Hitze coagulirbar ist; das in der Hitze entstehende Gerinnsel löst sich aber zum Unterschied von allen anderen Eiweissstoffen sehr leicht in Mineralsäuren auf. Ich kann hier nicht die Thatsache übergehen, dass das Histon in der physiologischen Chemie sehr vernachlässigt wurde und dass man den Einwand erhob, es sei das Histon vielleicht ein Kunstproduct der Salzsäure Dieser Einwand ist vollkommen ungerechtfertigt; denn erstens ist an Gewinnung von Substanzen aus dem thierischen Organismus ohne chemische Reagentien nicht zu denken und zweitens ist das Histon als Base an eine verhältnissmässig starke Säure, das Nucleïn, gebunden. Man muss daher die Verbindung mit einer Säure angreifen, um das Histon überhaupt zu erhalten.

Das Nucleohiston als Ganzes könnte man vielleicht als saures Salz auffassen. Aus der Lösung in Natriumhydrat fällt nämlich durch Alkohol die Natriumverbindung des Nucleohistons, welche in Wasser leicht löslich ist. In der wässerigen Lösung der letzteren fällt durch Baryumchlorid die Barytverbindung. Das Nucleohiston gibt Millon'sche Reaction, Xantoproteïnreaction und schwache Biuretreaction nach längerem Stehen. Es zersetzt Wasserstoffsuperoxyd, welche Eigenschaft nach der Behandlung mit Alkohol und Aether verloren geht.

d) Die quantitative Zusammensetzung der Leucocyten.

Auf Aufforderung des Herrn Professor Kossel führte ich auch eine Analyse der aus der Thymusdrüse isolirten Leucocyten aus. Meines Wissens ist das die erste Analyse einer normalen thierischen Zelle. Das Nucleohiston wurde so bestimmt, dass ich die Leucocyten 24 Stunden mit Wasser digerirte, nachher filtrirte und das Filtrat mit Essigsäure fällte. Der Niederschlag wurde gesammelt, mit kaltem und heissem Alkohol, schliesslich mit Aether gewaschen, bei 115 Grad bis zur Gewichtsconstanz getrocknet und mitsammt dem

gewogenen Filter gewogen. Nachher wurde zur Feststellung der Reinheit der Phosphorgehalt bestimmt. Das Histon wurde als Ammoniakniederschlag, das Glykogen nach Brücke's Methode und die Nucleïnbasen nach der früher erwähnten Methode bestimmt. Die anderen Substanzen bestimmte ich nach der in Hoppe-Seyler's Handbuch der Analyse angegebenen Methode.

Es ergaben sich im Mittel folgende Zahlen:

Trockensubstanz der Leucocyten im Durchschnitt: 11,49 %.

Auf 100 Theile der Trockensubstanz fand ich:

Gesammtphosphorgehalt	3.01	%.
Gesammtstickstoffgehalt	15,03	»
Eiweissstoffe	1,76	»
Leuconucleïn	68,78	»
Histon	8,67	»
Lecithin	7,51	»
Fette	4,02	»
Cholesterin	4,40	»
Glykogen	0,80	»
Silberverbindung der Nucleïnbasen	15,17	»

Geradezu frappant ist die ungeheure Menge von Nucleohiston und die verschwindend kleine Menge der Eiweisskörper. Ich muss noch bemerken, dass mehrere Analysen gut übereinstimmende Zahlen ergaben. Zum Schluss sei es mir gestattet, dem Herrn Professor Kossel für seine gütige Unterstützung meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Nachtrag.

Analytische Belege zur quantitativen Zusammensetzung der Leucocyten.

1. Trockensubstanzbestimmungen.

a) 10,741 gr. feuchten Leucocytenbreies hinterliess bei 110° zur Constanz getrocknet 1,0546 gr. Rückstand = **9,82** % Trockensubstanz.

b) 6,0586 gr. feuchter Leucocyten hinterliessen bei 110° getrocknet 0,5634 gr. = **9,30** % Trockensubstanz.

c) 9,5902 gr. hinterliessen 1,288 gr. Rückstand = **13,43** % Trockensubstanz.

d) 86656 gr. hinterliessen 1,1544 gr. Rückstand = **13,32** % Trockensubstanz.

2) Bestimmungen des Gesammtphosphorgehaltes.

a) 0,9405 gr. trockener Leucocyten gaben 0,1016 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **3,017** % P.

b) 0,4722 gr. trockener Leucocyten gaben 0,052 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **3,075** % P.

c) 0,7725 gr. trockener Leucocyten gaben 0,0814 gr. $Mg_2P_2O_7$ = **2,94** % P.

3) Bestimmungen des Gesammtstickstoffgehaltes.

(Nach Kjeldahl.)

a) 0,2270 gr. trockene Leucocyten verbrauchten zur Neutralisation des alkalischen Destillats 23,51 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure = **14,86** % N.

b) 0,2165 gr. trockene Leucocyten verbrauchten zur Neutralisation des Destillats 23,51 cbcm. $^1/_{10}$ N-Oxalsäure = **15,20** % N.

Untersuchungen über die chemische Beschaffenheit der elastischen Substanz der Aorta.

Von

Hugo Schwarz aus Budapest.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg.)

(Der Redaction zugegangen am 25. September 1893.)

Die bisherigen Untersuchungen über das Elastin beziehen sich ausschliesslich auf die aus dem Nackenbande des Rindes dargestellte Substanz, wie sie durch Behandlung desselben mit Säuren, Alkalien und kochendem Wasser isolirt wurde.

Bekanntlich stellt aber ausser dem Nackenbande und dem elastischen Bindegewebe das Gefässsystem das grösste Contingent der elastischen Gewebe im Organismus. Während nun das Nackenband in physiologischer Beziehung ein relativ indifferentes Organ darstellt, hat das elastische Gewebe der Gefässe eine wichtige Function zu erfüllen, die bei der Erhaltung des Gefässtonus zum Ausdrucke kommt. Ueber die chemischen Eigenschaften des Gefässelastins ist in der Litteratur nichts zu finden, wesshalb ich dasselbe auf Anregung meines hochverehrten Lehrers, Herrn Prof. F. Hoppe-Seyler, einer chemischen Untersuchung unterzogen habe.

Darstellung des Gefässelastins.

Zur Darstellung der elastischen Substanz benützte ich ihre relative Widerstandsfähigkeit gegenüber Magensaft.

Zu dem Zwecke wurden von der nahe am Herzen abgeschnittenen Aorta des Rindes 15—30 cm. lange Stücke in möglichst zerkleinertem Zustande, bei Zimmertemperatur von

17—22° der Einwirkung von künstlichem Magensaft ausgesetzt, der durch Extraction der abpräparirten, feinzerhackten Magenschleimhaut vom Schwein, mit 4 ‰ HCl nach der Vorschrift[1]) Hoppe-Seyler's dargestellt wurde. Damit die zunächst entstandenen Verdauungsproducte der übrigen Gewebsbestandtheile der weiteren Einwirkung des Magensaftes nicht hinderlich seien, wurde die Flüssigkeit nach 24stündigem Stehen abgegossen und durch frischen Magensaft ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde auch diese Flüssigkeit abgegossen und der unverdaute Rückstand mit Wasser, das durch Sodalösung schwach alkalisch gemacht worden war, so lange gewaschen, bis nicht nur die abfliessende Flüssigkeit nicht mehr sauer reagirte, sondern auch ein auf die Substanz gepresster blauer Lackmuspapierstreifen nicht mehr geröthet wurde. Nachdem durch abermaliges Behandeln mit Wasser die Sodalösung entfernt war, setzte ich die Substanz während 6 Stunden siedendem Wasser aus, das dabei oft erneuert wurde, durch welchen Process die elastischen, zum Theil gefensterten Membranen sich in dem Masse loslösten, als das sie zusammenhaltende Gewebe beim Sieden gelöst wurde. Die so gewonnene Substanz wurde bei 100° getrocknet und in kleine Körner von ungefähr Hirsenkorngrösse zerstossen und wieder der oben beschriebenen Procedur unterworfen.

Durch diese Behandlung lässt sich das Bindegewebe und die spärliche Muskulatur der Aorta leicht entfernen; hingegen ist, wie weiter unten gezeigt wird, neben der elastischen Substanz in der Aorta noch ein anderer Proteïnkörper vorhanden, der ebenfalls vermöge seiner Widerstandsfähigkeit gegenüber von Magensaft bei der obigen Procedur noch übrig bleibt. Denn nach dem Kochen mit Wasser erhielt ich stets eine schwach opalescirende Flüssigkeit, welche die Biuret- und die Millon'sche Reaction (letztere nur schwach) gab und in welcher ein Tropfen verdünnter Essigsäure und auch ein Tropfen von ganz verdünnten Mineralsäuren in der Kälte sowohl, wie auch beim Erwärmen einen flockigen, von der

---

[1]) F. Hoppe-Seyler, Handbuch der physiol.- und pathol.-chemischen Analyse, 6. Aufl., S. 293.

gesammten organischen Substanz herrührenden Niederschlag erzeugte, der sich auf Zusatz eines Neutralsalzes nicht löste, sondern nur in concentrirter Essigsäure und in concentrirten Mineralsäuren löslich war und der die Millon'sche (nur ganz schwach), die Adamkiewicz'sche und die Xanthoproteïn-Reaction gab. Sprach schon die Widerstandsfähigkeit gegenüber von Magensaft, sowie der Umstand der Fällbarkeit aus wässeriger Lösung durch Essigsäure gegen die Annahme, es handele sich hierbei um Leim, so wurde dennoch die Eigenschaft des letzteren, beim Erkalten zu gelatiniren, wenn er nicht zu lange gekocht hat, geprüft. Zu diesem Zwecke wurden 30 gr. der körnigen Substanz ½ Stunde lang mit siedendem Wasser gekocht, die darüber stehende schwach opalescirende Flüssigkeit abgegossen und auf dem Wasserbade auf ein ganz kleines Volumen eingeengt: die Lösung gelatinirte jedoch beim Erkalten nicht. Unter den beschriebenen Proteïnkörpern ist nicht ein einziger bekannt, welcher einer so energischen Behandlung mit Magensaft widerstände, in heissem Wasser nur schwer löslich wäre und im übrigen die genannten Eigenschaften böte. A priori konnte nicht entschieden werden, ob diese in Wasser allerdings schwer lösliche Substanz vielleicht die elastische Substanz der Aorta oder nur ein mit dem Gefässelastin gemengter Körper wäre. Da jedoch nach abermaligem Kochen von 20 gr. fein gepulverter Substanz mit Wasser schliesslich eine vollkommen klare, gar keine organische Substanz mehr enthaltende Flüssigkeit resultirte, so war die Frage klar: die elastische Substanz war noch durch einen fremden Körper verunreinigt.

Am meisten stimmen die Eigenschaften dieses Körpers mit denen einer von Siegfried[1]) jüngst beschriebenen aus der Darmumcosa vom Hunde isolirten, von ihm als Reticulin bezeichneten Substanz überein. Bei der grossen morphologischen Aehnlichkeit des elastischen Gewebes mit dem reticulirten Gewebe ist auf Grund dieser chemischen Eigenschaften jedenfalls die Wahrscheinlichkeit der Annahme, im elastischen

---

[1]) Siegfried, Ueber die chemischen Eigenschaften des reticulirten Gewebes, Habilitationsschrift 1892.

Gewebe der Aorta seien elastische Fasern mit Fasern des reticulirten Gewebes verflochten, sehr gross, wenn auch morphologisch die beiden von einander nicht unterscheidbar sind.

Zum Zwecke der Reinigung also der elastischen Substanz von dem reticulinartigen Bestandtheile wurde sie, allerdings unter Aufwand grosser Mühe fein pulverisirt, mit viel und oft erneuertem Wasser so lange im Sieden erhalten, bis die Flüssigkeit ganz klar abfloss und keine Spur organischer Substanz mehr enthielt. Alsdann wurde das nunmehr von anderen Proteïnstoffen befreite Gefässelastin 24 Stunden lang mit 5 % Salzsäure in der Kälte behandelt, mit Wasser vollständig ausgewaschen, mit Alkohol entwässert und mit Aether entfettet; die Extraction geschah so lange, bis nach Verdunsten des Extractionsmittels kein Rückstand mehr hinterblieb, ein Verfahren, das in Folge des fein pulverisirten Zustandes der Substanz bereits nach der dritten Extraction — jede Extraction dauerte 24 Stunden — zum Ziele führte. Die so dargestellte Substanz bietet getrocknet ein bräunlich-gelbes Aussehen, ist vollkommen unlöslich in Wasser, selbst nach tagelangem Kochen, unlöslich in Alkohol und Aether, in verdünnten Säuren und in verdünnten Alkalien.

Sie löst sich leicht in conc. Salzsäure mit violetter Farbe, ist schwer löslich in conc. Schwefelsäure, hingegen sehr leicht löslich in rauchender Salpetersäure. In conc. Essigsäure löst sie sich nicht einmal beim Sieden; sie gibt die Millon'sche sowie die Xanthoproteïn-Reaction. Die über H_2SO_4 zum constanten Gewicht getrocknete Substanz gab bei der Analyse folgende Werthe:

I. 0,2054 Substanz gaben 0,4074 CO_2 und 0,1323 H_2O.
II. 0.1844 Substanz gaben 0,3598 CO_2 und 0,1116 H_2O.
III. 0,2047 Substanz gaben 0,4011 CO_2 und 0,1300 H_2O.
IV. 0,4346 Substanz gaben 0,07296 Stickstoff[1]).
V. 0,4296 Substanz gaben 0,07098 Stickstoff.
VI. 0,5144 Substanz gaben 0,08597 Stickstoff.
VII. 2,7490 Substanz gaben 0,0826 $BaSO_4$ entspr. 0,01135 Schwefel.
VIII. 3,1068 Substanz gaben 0,0768 $BaSO_4$ entspr. 0,0105 Schwefel.

---

[1]) Methode nach Kjeldahl.

IX. 2,067 Substanz gaben 0,0586 $BaSO_4$ entspr. 0,00806 Schwefel.
X. 0,9518 Substanz hinterliessen 0,0074 Asche.
XI. 0,6314 Substanz hinterliessen 0,0043 Asche.

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	Mittel.
E . . %[1]	54,46	53,59	53,81	—	—	—	—	—	—	—	—	53,95
H . . »	7.25	6,77	7,08	—	—	—	—	—	—	—	—	7,03
N . . »	—	—	—	16,78	16,52	16'71	—	—	—	—	—	16,67
S . . »	—	—	—	—	—	—	0,41	0,33	0,39	—	—	0,38
Asche »	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,77	0,68	0,72

Der Schwefel wurde nach der Methode von Hammarsten[2]) bestimmt.

Um zu sehen, ob der Schwefel sich durch Kochen mit KOH abspalten lässt, wurden 10 gr. gepulverten Gefässelastins mit 1 Liter 1proc. KOH 4 Stunden lang unter dem Rückflusskühler gekocht, darauf mit Wasser ausgewaschen. In der getrockneten Substanz, die durch das Kaliumhydroxyd nicht angegriffen, höchstens spurenweise eine gequollene Beschaffenheit angenommen hatte, konnte nach Schmelzen mit Kali und Salpeter gar kein Schwefel nachgewiesen werden. Nach obiger Behandlung blieben trotzdem alle Eigenschaften des nicht entschwefelten Elastins erhalten.

Dieser Versuch weist auf ein eigenthümliches Verhalten des Schwefels im Elastin hin, gegenüber von anderen Proteïnstoffen, die durch Kochen mit Kalilauge nur einen Theil des Schwefels abgeben, während ein anderer Theil dabei sich nicht abspalten lässt; eine Thatsache, die bekanntlich zur Annahme von wenigstens 2 Atomen Schwefel in den letzteren zwingt, von welchen das eine und zwar das durch Kalilauge nicht abspaltbare Atom als das «fest gebundene», das andere, durch Kalilauge abspaltbare, als das «locker gebundene» bezeichnet wird. Es erscheint daher der Schluss gerechtfertigt, dass im Molecüle des Aortenelastins möglicherweise nur ein

---

[1]) Es wurde auf aschefreie Substanz berechnet.

[2]) Zeitschrift f. physiol. Chem., Bd. VII, S. 257, und ebenda, Bd. IX, S. 288.

einziges Atom enthalten ist; bei dieser Annahme müsste dann das Moleculargewicht dieses Körpers mindestens gleich 8686 sein, was im Vergleiche mit den von anderen Autoren für Proteïnstoffe angegebenen Werthen nicht zu hoch erscheint, wie folgende Tabelle zeigt:

	Mol.-Gew.
Lieberkuhn's Alkalialbuminat[1]	1612
Albumin (Harnack)[2]	4679,4
» (Loew)[3]	4836
Conglutin (Kalkverbindung) (Grübler)[4]. .	5081
Elastin aus der Aorta	8686
Reticulin (Siegfried)[5]. . . . . . . ,	10000

Aus dieser Tabelle entnehmen wir ferner die Thatsache, dass die angegebenen Moleculargrössen der Proteïnstoffe — freilich sind sie nicht als exact bewiesen zu betrachten — mit der Verdaulichkeit derselben in directem Verhältnisse stehen: Je schwerer die Proteïnkörper durch die Verdauungsfermente gelöst werden, um so grösser ihr Moleculargewicht. Die Annahme Siegfried's, das Molecurgewicht[6]) für das Elastin aus dem Nackenbande sei ca. 70,000, bei der er sich auf die übereinstimmenden Angaben von Horbaczewsky[7]) und Erlenmeyer und Schäffer[8]) stützt, die 0,25 °/₀ Tyrosin aus der elastischen Substanz des Nackenbandes erhielten, scheint mir nicht begründet zn sein, da wir gar keinen festen Anhaltspunkt dafür haben, dass die bei der Spaltung mit Säuren oder Alkalien aus den Proteïnstoffen entstehenden Atomcomplexe als im Proteïnmolecül präformirte zu betrachten sind. —

[1]) Nach Loew entspricht dies dem Pepton. Siehe Loew, Pflüg. Arch. 31, S. 399.

[2]) Zeitschrift f. phys. Chemie, Bd. V, S. 206.

[3]) S. Loew, l. c.

[4]) Journ. f. pr. Ch. (2) 23, S. 135.

[5]) L. c. S. 23.

[6]) Ebenda.

[7]) Wiener Akad. Sitzungsberichte, II. Abthlg., S. 657, 1885.

[8]) Journ. f. pr. Chemie 80, S. 367, 1860,

Seit Liebig's Streit mit Mulder[1]) nimmt man an, es sei unmöglich, die Proteïnstoffe zu entschwefeln, ohne einen gänzlichen Zerfall des Moleculs herbeizuführen. Da aber das Gefässelastin durch Kochen mit Kalilauge vollkommen entschwefelt wurde, ohne hierbei seine oben angegebenen Eigenschaften zu verlieren, so liegt gar kein Grund vor, einen Zerfall des Moleculs durch diesen Process bei ihm anzunehmen. Das Gefässelastin enthält vielmehr den Schwefel in einer Form, in welcher er aus dem Moleciile durch Kalilauge vollkommen abspaltbar ist, in derjenigen Form nämlich, in welcher er als «locker gebunden» bezeichnet wird. Es gewinnt also wiederum die Annahme der 2 möglichen Bindungen des Schwefels im Proteïnmolecüle hierdurch eine erneute Stütze.

Spaltung des Aortenelastins mit gespannten Wasserdämpfen.

6 gr. der gepulverten Substanz wurden im zugeschmolzenen Rohre aus Kaliglas mit 60 cm.^{3} Wasser auf 100° erhitzt; da sich nach 18stündigem Erhitzen nur wenig gelöst hatte, steigerte ich die Temperatur auf 130—140° C. Nach 15 Stunden war alles gelöst. Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt. Stets resultirte eine fluorescirende bräunlichgelbe Lösung von wenn auch ganz schwacher Alkalescenz. Letztere rührte ohne Zweifel davon her, dass durch die überhitzten Wasserdämpfe Alkali aus dem Glase abgespalten wurde. Eine Probe der zusammengegossenen und mit Thierkohle entfärbten Flüssigkeiten trübte sich beim Erhitzen im Reagensgläschen nicht. Hingegen entstand auf Zusatz eines Tropfens ganz verdünnter Essigsäure beim Erwärmen eine deutliche Trübung mit Niederschlag, der nach dem Erkalten vollkommen schwand. Um diesen Körper von den anderen Spaltungsproducten zu trennen, neutralisirte ich die Lösung der hydrolytischen Spaltungsproducte durch Zufügen weniger Tropfen 0,5 °/₀ Essigsäure. Der beim Erwärmen entstandene reichliche Niederschlag wurde heiss abfiltrirt und in Wasser gelöst. Die Lösung zeigte alle Reactionen, welche

[1]) Vergl. die Abhandlung Loew's: Ueber Eiweis und Oxydation desselben. Journ. f. pr. Ch. (2) 31, S. 133.

Horbaczewsky für sein Hemielastin[1]) (aus dem Nackenbande) und Chittenden und Hart für ihre Protelastose[2]) (ebenfalls aus dem Nackenbande) als charakteristisch bezeichnen: Trübung beim Erwärmen, Aufklären nach dem Erkalten, Fällung durch Essigsäure und Ferrocyankali, durch 30 % Essigsäure und Kochsalz und andere Fällungsmittel des Hemielastins Horbaczewsky's. Das Filtrat vom Niederschlage hingegen gab die Reactionen, welche von den genannten Autoren[3]) für das Elastinpepton beziehungsweise Deuterolestose angegeben werden. Hieraus folgt:

1. Bei der hydrolytischen Spaltung des Aortenelastins mit gespannten Wasserdämpfen entstehen dieselben Producte, wie bei der Spaltung des Nackenbandelastins mit Verdauungsfermenten oder auch durch Kochen mit Wasser, das eine Spur Salzsäure enthält[4]).

2. Es tritt nicht nur ein einheitliches Product auf, wie es einerseits von M. S. Schulze[5]) — reiner Leim der elastischen Fasern —, andererseits von Horbaczewsky[6]) — nur Elastinpepton — behauptet wird, sondern es entstehen ganz dieselben Producte, wie bei jeder anderen hydrolytischen oder fermentativen Spaltung (also durch Trypsin, Pepsin, mit HCl angesäuertem Wasser) des Nackenbandelastins; mit dem Vorbehalte allerdings, dass, wenn die verschiedenen Spaltungsproducte, von einander nur graduell unterschieden in einander übergehen können, das Hemielastin (Protelastose) bei weiterem Erhitzen in Elastinpepton (Deuteroelastose) übergehen könne. Ob hierbei auch wahre Peptone im Kühne'schen Sinne entstehen, habe ich wegen Mangel an Material nicht untersucht. Die Thatsache, dass Horbaczewsky bei der Spaltung des Nackenbandelastins mit gespannten Wasserdämpfen nur sein Elastinpepton fand, hat zur Ursache, dass er vermuthlich die

[1]) Zeitschrift f. phys. Chemie, Bd. VI, S. 337.
[2]) Zeitschrift f. Biologie, Bd. 25, S. 368.
[3]) L. c.
[4]) Chittenden und Hart, Zeitschrift f Biologie, Bd. 25, S. 373.
[5]) Annal. d. Chem. u. Pharm., Bd. 71, cit. nach Horbaczewsky.
[6]) L. c., S. 344.

Reaction der Flüssigkeit nicht beachtete und die charakteristische Reaction für Hemielastin — durch Erwärmen der Lösung auszufallen, um sich beim Erkalten wieder zu lösen — nach übereinstimmenden Angaben Horbaczewsky's und Chittenden und Hart's nur bei neutraler oder saurer Reaction gelingt.

Zersetzung des Gefässelastins mit Salzsäure [1]).

100 gr. Substanz wurden mit 50 Theilen Zinnchlorür, dem einige aus Stanniolstreifen zusammengerollte Kügelchen beigemengt waren, und 400 Gewichtstheilen 20 % Salzsäure 80 Stunden lang am Rückflusskühler erhitzt. Das oben hinausragende Rohr war mittelst eines Stückchens Caoutchouc und Glasrohrs mit einem nur wenig Bleiacetatlösung enthaltenden Kölbchen verbunden, in dem schon im Verlaufe der ersten Stunde eine Bräunung auftrat und sich später ein schwarzer Niederschlag von Bleisulfid absetzte, zum Beweise, dass sich Schwefelwasserstoff entwickelt hatte. Nach dem Erkalten verdünnte ich die Flüssigkeit auf das zehnfache Volumen mit Wasser und fällte das Zinn durch Schwefelwasserstoff aus. Das wasserhelle Filtrat wurde, nachdem es auf ca. 1,5 Liter eingeengt worden war, noch heiss mit einer heiss gesättigten Lösung von 600 gr. krystallisirter Phosphorwolframsäure [2]) gefällt. Es entstand sofort ein schwerer körniger Niederschlag, der sich bald zu Boden senkte. Die Hauptmenge der phosphorwolframsauren Verbindungen schied sich aber erst beim Erkalten in Form einer krystallinischen, die Gefässwandungen bedeckenden Kruste ab. Nach dem Stehen über Nacht wurde der Niederschlag abgesaugt und mit einer 10 % ausserdem noch 5 % Schwefelsäure enthaltenden Phosphorwolframsäurelösung chlorfrei gewaschen.

---

[1]) Es wurde die von Hlasiwetz und Habermann (Annal. d. Chem. u. Pharm.), Bd. 169, S. 150, 1873, auch Journ. f. pr. Chem. (2), Bd. VII, S. 397) eingeschlagene, von Drechsel und Siegfried (Ber. d. ch. Ges., Bd. XXIV, S. 418, 1891) modificirte Methode befolgt.

[2]) Präparat von Merck.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag.

Es galt zu untersuchen, ob in dem, durch Phosphorwolframsäure erzeugten Niederschlage die von Drechsel unter den Spaltungsproducten des Caseïns entdeckten, von E. Fischer aus Leim, von Siegfried aus Conglutin, Glutenfibrin, Hemiproteïn, Oxyprotsulfonsäure, Eieralbumin und auch aus Reticulin dargestellten, von Hedin bei der Pankreasverdauung von Fibrin gefundenen Basen, Lysin und Lysatinin vorhanden seien[1]). Zu diesem Behufe wurde der Niederschlag mit Wasser aufgekocht, wobei nur ein Theil in Lösung ging und mit einem geringen Ueberschusse von Barythydrat versetzt; hierbei trat der Geruch nach Ammoniak auf, das durch die Phosphorwolframsäure gefällt und jetzt durch Barythydrat aus der Verbindung befreit war. Nun wurde das Filtrat mit Kohlensäure gesättigt, der Ueberschuss derselben durch Kochen ausgetrieben. Auf Zusatz einer conc. Lösung Silbernitrats entstand im Filtrat ein amorpher Niederschlag, der nach 12 Stunden abfiltrirt die Eigenschaften der amorphen Silberverbindung Siegfried's aufwies[2]). Ich untersuchte denselben nicht weiter, sondern engte das Filtrat zum dünnen Syrup ein, wobei von nicht geringen Mengen reducirten Silbers öfters abfiltrirt werden musste und behandelte diese Lösung durch allmäligen Zusatz von Alkohol. Während Siegfried[3]) bei seinen Untersuchungen einiger Proteïnstoffe die Ausscheidung einer, die Drechsel'sche Base des Lysin $C_6H_{14}N_2O_2$ enthaltenden, schmierigen, theils undeutlich krystallinischen Masse beobachtete, kam ich hierbei zu einem anderen Resultat. Allmäliger Zusatz von Alkohol

---

[1]) E. Drechsel. Zur Kenntniss der Spaltungsproducte des Caseïns. (Vorl. Mittheil.) Journ. f. pr. Chemie (2), Bd. 39, S. 424, sowie auch Ber. d. Königl. Sächs. Gesellsch. der Wissensch., 23. April 1889. Derselbe. Ueber Bildung von Harnstoff aus Eiweiss, Ber. d. D. chem. Ges., Bd. 23, S. 3096. Derselbe. Arch. f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abtheil.) 1891, S. 248. Der Abbau der Eiweissstoffe. Hier befindet sich ein Auszug aus den Abhandlungen E. Fischer's und Hedin's. Siegfried, Ber. d. Deutschen chem. Ges., Bd. 24, S. 418. Derselbe, Ueber die chem. Eigenschaft des reticulirten Gewebes. Habilitationsschrift 1892.

[2]) L. c.

[3]) L. c.

bewirkte nämlich, selbst nachdem ich den Syrup noch mehr eingeengt hatte, ausser einer schwachen Trübung und Ausscheidung spärlicher öliger Tropfen zunächst nichts. Erst auf Zusatz von wenig Aether entstand milchige Trübung, welche sich nach einiger Zeit klärte; zugleich traten auf den Wandungen des Gefässes ins Lumen hineinragende lange weisse Nadeln auf, die sich auf Zusatz von mehr Aether vollständig ausschieden. Nach Auswaschen mit absolutem Alkohol, in dem sie vollständig unlöslich waren, und Trocken über H_2SO_4 erhielt ich bei der Silberbestimmung 27,96 % Ag. Berechnet sind für $C_6H_{13}N_3O_2 . HNO_3 . AgNO_3$ 27,55 % Ag.

Offenbar war hier die Substanz, welche, wie nachfolgende Analysen zeigen, lediglich aus der Silberverbindung des Drechsel'schen Lysatinins bestanden, mit ein wenig Silbernitrat verunreinigt. Nach einmaligem Umkrystallisiren war das Präparat vollkommen rein. Dasselbe ergab folgende Werthe:

I. 0,2221 Substanz gaben 0,1477 CO_2 entspr. 0,0402 C und 0,063 H_2O entspr, 0,007 H.

II. 0,2417 Substanz gaben 0,1646 CO_2 entspr. 0,0448 C und 0,0846 H_2O entspr. 0,0094 H.

III. 0,2239 Substanz gaben 33,9 cbcm. Stickstoff bei 23,1° T. und 750,6 Barm.

IV. 0,1673 Substanz gaben 0,0607 AgCl entspr. 0,0457 Ag.

V. 0,1207 Substanz gaben 0,0443 AgCl entspr. 0,0334 Ag.

Berechnet für $C_6H_{13}N_3O_2 . HNO_3 . AgNO_3$.	Gefunden				
	I.	II.	III.	IV.	V.
C 18,36 %	18,09	18.53	—	—	—
H 3,57 %	3,15	3,89	—	—	—
N 17,85 %	—	—	18,02	—	—
Ag 27,55 %	—	—	—	27,31	27,67

Aus den Mutterlaugen konnte nach Verdunsten des Alkohols und Aethers Kalium und Natriumplatinchlorid in geringer Menge dargestellt werden. Indess fielen alle Versuche, organische Substanz in Form eines Platinsalzes daraus zu isoliren, negativ aus. Trotzdem möchte ich die Behauptung, dass das Lysin Drechsel's, welches bisher stets in Gemeinschaft

mit Lysatinin gefunden wurde, hierbei nicht entsteht, nicht aufstellen, denn es kann ja dasselbe schliesslich hier in so geringer Menge aufgetreten sein, dass es mit Hilfe der angegebenen Methode nicht isolirt werden konnte. Das Lysatinin hingegen, die interessante Base Drechsel's, welche, wie er gezeigt hatte, beim Kochen mit Aetzbarytlösung Harnstoff liefert, erhielt ich als Silbersalz in sehr schönen Krystallnadeln, die unter dem Einfluss des Tageslichtes Silberglanz angenommen haben.

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag.

Zur Entfernung von Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure wurde das Filtrat mit Barythdrat in geringem Ueberschusse versetzt; das Baryum genau mit Schwefelsäure wieder ausgefällt und das Filtrat, das so die ganze Menge der Salzsäure enthielt, zum Syrup eingedampft. Trotz wochenlangem Stehen im Eisschrank und verschiedenartigen, mühsamen Versuchen, den Syrup zur Krystallisation zu bringen, erhielt ich nicht einmal theilweise Abscheidung von Krystallen. Wäre auch nur eine Spur Glutaminsäure unter den Spaltungsproducten enthalten, so würde sich dieselbe durch die in eiskalter conc. Salzsäure unlöslichen Krystalle der salzsauren Verbindung derselben ausgeschieden haben.

Nun wurde die Salzsäure theils auf dem Wasserbade, theils durch Kochen des vorher mit Wasser verdünnten Syrups mit frisch gefälltem Bleioxydhydrat entfernt. Nachdem ich das von dem Bleiniederschlag abfiltrirte, durch Schwefelwasserstoff entbleite Filtrat bis zu einem gewissen Grade eingedampft hatte, schied sich beim Erkalten Tyrosin in sehr schön ausgebildeten, seidenglänzenden, zu Büscheln vereinigten Krystallen aus, die durch die üblichen Reactionen und Krystallform als solche identificirt wurden. Das Filtrat vom Tyrosin gab mit Millon's Reagens gekocht eine so geringe Färbung, dass ich annehmen musste, dass das Tyrosin vollständig auskrystallisirt war.

Je weniger verschiedenartige Substanzen in einer Lösung enthalten sind, um so besser gelingt bekanntlich die Aus-

krystallisation derselben. In der That gelang es mir, im vorliegenden Falle bei genauem Treffen des Concentrationsgrades der Mutterlauge das Tyrosin vollständig und in selten schönen Krystallen zu isoliren; aus der Mutterlauge nämlich, aus der ich einen Theil der Spaltungsproducte vorher durch Fällung mit Phosphorwolframsäure entfernt hatte.

Beim weiteren Eindampfen erhielt ich leucinartige Ausscheidungen in Form der bekannten Schollen und Häute. Nach wiederholtem Eindampfen, Erkaltenlassen und Abheben der krystallinischen Schollen und Häute wurden dieselben mit viel absolutem Alkohol (99,5 %) sehr oft ausgekocht, die nach dem Erkalten ausgeschiedenen Substanzen wieder mit kochendem absol. Alkohol behandelt, bis ich nach dem Erkalten des Extractionsmittels sehr schöne schimmernde Schuppen erhielt. Dieselben gaben die üblichen Leucinproben und zwar die von Scherer als auch die Sublimationsprobe.

Da aber nach der Beschreibung der Autoren die Amidovaleriansäure hinsichtlich ihrer chemischen Eigenschaften sowohl, als auch in Bezug auf ihre Krystallform dem Leucin sehr ähnlich ist, in Alkohol jedoch schwerer löslich ist als Leucin und daher aus einer alkoholischen Lösung, die beide Substanzen neben einander enthält, zuerst auskrystallisiren würde, so genügte der qualitative Nachweis des Leucins nicht; nur die Analyse konnte hier entscheiden.

I. 0,2307 Substanz über H_2SO_4 bis zum constanten Gewicht getrocknet, gaben 0,4678 CO_2 entspr. 0 1275 C. und 0,1998 H_2O entspr. 0,0222 H.

II. 0,2614 Substanz gaben 0,0333 NH_3 entspr. 0,0274 N.

	Ber. für Leucin:	Gefunden:
C	54,96 %.	55,26 %.
H	9,92 %.	9,63 %.
N	10,68 %.	10,48 %.

Die Krystalle bestanden somit aus reinem Leucin.

Von der darauf mit Wasser verdünnten Mutterlauge versetzte ich zur Prüfung auf Asparaginsäure eine Probe davon mit einer schwach ammoniakalischen Silberlösung. Eine amorphe Fällung — die Silberverbindung der gesammten Asparagin-

säuremenge[1]) — trat hierbei nicht auf, nur schwache Trübung. Asparaginsäure war somit unter den Spaltungsproducten ausgeschlossen, eine Thatsache, welche sich mit dem Fehlen ihrer nächst homologen Glutaminsäure sehr wohl vereinbaren lässt. Bei den Spaltungen der Proteïnstoffe sammelte sich das Glycocoll immer in der letzten Mutterlauge an. Um diese Amidosäure, falls sie hier entstanden war, zu isoliren, befreite ich die Mutterlauge von dem Reste der Salzsäure, der durch das Bleioxydhydrat nicht entfernt werden konnte, durch Behandeln mit Silberoxyd und dampfte sie ein.

Da ich aber auf diese Weise keine schönen Krystalle erzielte, so benützte ich zur Isolirung dieser Säure die Leichtlösbarkeit der salzsauren Verbindung derselben in Alkohol, wie sie von Horbaczewsky[2]) mit Erfolg angewendet wurde. Zu diesem Zwecke wurde der Syrup mit Salzsäure fast zur Trockne eingedampft und mit 96,5 % Alkohol ausgekocht. Nach vollständiger Verdunstung des Alkohols und nach Lösung des trockenen Rückstandes in Wasser entchlorte ich durch Silberoxyd und dampfte auf ein kleines Volumen ein. Es schieden sich im Exsiccator nach einiger Zeit harte, süss schmeckende Krystalle aus, welche bei der Stickstoffbestimmung folgende Werthe ergaben:

I. 0,2705 Substanz über H_2SO_4 getrocknet gaben 0,0601 NH_3 entspr. 0,04949 N.

II. 0,2491 Substanz gaben 0,0563 NH_3 entspr. 0,04636 N.

Ber. f. Glycocoll:	Gefunden:	
	I.	II.
18,66 %.	18,30 %.	18,61 %.

Schliesslich sei bemerkt, dass ebenfalls durch Ueberführung des in Alkohol unlöslichen Theiles der leucinartigen Ausscheidungen in die salzsaure Verbindung und Auskochen mit Alkohol auch Glycocoll erhalten wurde.

---

[1]) Siegfried, Ber. d. d. ch. G., Bd. 24, S. 421.

[2]) Ueber die durch Salzsäure aus den Albuminoiden entstehenden Spaltungsproducte. Wiener Akad. Sitzungsberichte, 1879, II. Abth., und Ueber das Elastin (aus dem Nackenbande), ebenda, 1885.

Nachdem ich durch diese Untersuchungen unter den Spaltungsproducten des Gefässelastins einmal Schwefelwasserstoff, Ammoniak, Leucin, Glycocoll, Tyrosin und Lysatinin nachgewiesen hatte, stellte ich mir die weitere Aufgabe, zu untersuchen, ob unter denselben ausser den hydroxylirten Atomcomplexen, welche als Tyrosin abgeschieden wurden, auch nichthydroxylirte vorhanden seien. Zu diesem Zwecke spaltete ich 200 gr. der elastischen Substanz mit Salzsäure und Zinnchlorür. Nach dem Verdünnen mit Wasser, Befreiung von Zinn und Salzsäure, wurde der grösste Theil des Tyrosins abgeschieden; hierauf fast zur Trockne eingedampft und die ganze Masse durch mehrere Stunden fortgesetztes Kochen unter dem Rückflusskühler mit doppelt chromsaurem Kali und Schwefelsäure oxydirt. Schon nach kurzer Zeit entwickelte sich der Geruch nach Benzaldehyd und Cyanwasserstoff; ich leitete die entweichenden Producte unter Wasser, wodurch sie absorbirt wurden. In demselben konnten durch die üblichen Reactionen nicht unbeträchtliche Mengen Cyanwasserstoffs nachgewiesen werden. Ich liess die Flüssigkeit erkalten und extrahirte mit Chloroform. Nach Verdunsten desselben blieb eine grünliche aus Nadeln und Blättern bestehende Masse zurück. Dieselbe schmolz im Capillarröhrchen bei 117°. Nach dem Umkrystallisiren aus Petroläther, von dem es sehr leicht gelöst wurde, erhielt ich schneeweisse lange Nadeln, welche im Capillarröhrchen bei 120—121° schmolzen. Die Substanz wurde analysirt:

0,2109 Substanz über H_2SO_4 getrocknet gaben 0,5305 CO_2 entsp. 0,1447 C = 68,61 %, und

0,0861 H_2O entspr. 0,0095 H = 4,63 %.

Die Zahlen stimmen für Benzoësäure, welche 68,85 % Kohlenstoff und 4,91 Wasserstoff enthält.

Es wurde ein Silbersalz dargestellt, dasselbe ergab bei der Silberbestimmung:

0,1604 Substanz gaben 0,0998 AgCl entspr. 0,07493 Ag.

Ber. für benzoësaure Silber:	Gefunden:
46,92 %.	46,71 %.

Die Menge der erhaltenen Benzoësäure war 3,9 gr. = 1,95 %. Es ist somit bewiesen, dass unter den Spaltungsproducten ausser den hydroxylirten Atomcomplexen auch nichthydroxylirte vorhanden sind. Dass die, durch Oxydation der Spaltungsproducte erhaltene Benzoësäure auf die unter denselben befindlichen homologen Benzoësäuren bezw. auf Phenylamidofettsäuren zurückzuführen ist, kann wohl keinem Zweifel unterliegen.

Der Gedanke, aus Proteïnstoffen durch Oxydation Benzoësäure darzustellen, ist nicht neu[1]). Allein abgesehen von den bekannten Untersuchungen Salkowski's über Fleischfäulniss, bei denen er dreierlei aromatische Gruppen nachwies, ist es erst E. Schulze[2]) bei Verarbeitung eines Pflanzeneiweissstoffes, des Conglutins, gelungen, neben Tyrosin, durch Oxydation der Spaltungsproducte mit chromsaurem Kali und Schwefelsäure, sowohl Benzoësäure darzustellen, als auch die derselben zu Grunde liegende Phenylamidopropionsäure zu gewinnen. Ebenso erhielt er Benzoësäure aus Leim und Caseïn[3]).

Schmelzen des Gefässelastins mit Kali.

Beim Schmelzen mit Aetzkali wurde zunächst auf einige dabei entstandenen aromatischen Producte untersucht. Zu diesem Zwecke wurden 30 gr. der mit Wasser befeuchteten Substanz mit KOH im Oelbade geschmolzen. Schon in der Kälte machte sich intensiver Geruch nach Ammoniak bemerkbar. Das bei 170° aufgefangene Destillat zeigte starke Indolreaction; es wurde weiterhin bis 200° erhitzt. Theilweise Trennung des Indol vom Skatol konnte durch Ueberdestilliren mit Wasser bewirkt werden; ausserdem wies ich im Destillate Benzol nach. Aus dem ursprünglichen Retortenrückstande

---

[1]) Guckelberger: Annalen d. Ch. u. Ph., Bd. 64, S. 39. Schlieper: ebenda, Bd. 59, S. 1, cit. nach Schulze. Subbotin: Chem. Centralblatt 1865, S. 594. Loew: Journ. f. pr. Ch. 1885, Bd. 31, S. 144. Maly: Monatshefte für Chemie, Bd. VI, Bd. IX, Bd. X.

[2]) Zeitschr. f. ph. Ch., Bd. IX, S. 63.

[3]) L. c., S. 120 (Anhang).

wurde der Rest des Indol und Skatol durch Petroläther extrahirt; nach Befreiung von denselben und Ansäuern mit Schwefelsäure konnte ich Phenole überdestilliren.

Nencki und Schoubenko[1]) haben festgestellt, dass beim Schmelzen von Eiweiss und Leim mit Aetzkali neben Schwefelwasserstoff Methylmerkaptan entsteht. Um das Gefässelastin daraufhin zu untersuchen, unterwarf ich abermals 30 gr. Substanz der Kalischmelze 1 Stunde lang, wobei die Temperatur bei 250—280° erhalten wurde. Die Kalischmelze prüfte ich nach dem von Nencki und Schoubenko[2]) angegebenen Verfahren. Ich konnte jedoch kein Methylmerkaptan, sondern nur Schwefelwasserstoff nachweisen. Es scheint somit, dass bei der Kalischmelze der nur locker gebundenen Schwefel enthaltenden Proteïnkörper keine Merkaptane entstehen.

Die Litteratur über das Elastin aus dem Nackenbande reicht mehrere Jahrzehnte zurück[3]). Hingegen weichen die einzelnen Angaben, besonders was die elementare Zusammensetzung anbelangt, nicht unwesentlich von einander ab. Der Darstellungsweise nach zu urtheilen arbeiteten Horbaczewsky[4]) einerseits, Chittenden und Hart andererseits[5]) mit den reinsten Präparaten und deshalb sind die Arbeiten dieser Autoren über die elastische Substanz des Nackenbandes als die zuverlässigsten zu betrachten. Ueber Spaltung des Nacken-

---

[1]) Archives des scienc. biologiq. publiées par l'institut impérial de médic. expériment. à St-Pétersbourg, Tom 1, p. 315.

[2]) L. c.

[3]) Tilanus, s. Mulder's Physiolog. Chemie, Bd. II, S. 592. W. Müller: Zeitschr. für ration. Medicin, 3. Serie, Heft 2, 10, S. 180. Zollikofer: Annal. d. Ch. u. Pharm. 82, S. 176, 1861 Erlenmeyer u. Schaeffer: Journ. f. p. Ch. 80, S. 367, 1860, siehe auch Zeitschr. für Chem. u. Pharm., II. Jahrg. S. 315. Wälschli: Ueber Fäulniss des Elastin und Mucin, Journ. f. pr. Ch. (2) 17, S. 71, 1878. Etzinger: Zeitschr. f. Biol., Bd. 10. Morochowetz: Verdauungsgesetze, Auszug im Jahresb. f. Thierchemie 1886, cit. nach Chittenden und Hart. Ewald und Kühne: Die Verdauung als histol. Methode, Verhandl. d. Naturhistor. Med. Vereines zu Heidelberg, N. F., Bd. 1.

[4]) Ueber das Verhalten des Elastins bei der Pepsinverdauung, Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. VI, S. 330.

[5]) Ueber Elastin und Elastosen. Zeitschr. f. Biol., Bd. 25, S. 368.

bandelastins mit Salzsäure hat Horbaczewsky[1]) eine Arbeit geliefert, in welcher er unter denselben Leucin, Tyrosin, Glycocoll (Amidovaleriansäure?), Ammoniak, einen mit den Schützenberger'schen Leuceinen[2]) ähnlich zusammengesetzten Körper, jedoch weder Glutamin- noch Asparaginsäure gefunden hat. Bei der Fäulniss des Elastins aus dem Nackenbande konnte Wälschli[3]) weder Indol noch Skatol und auch kein Phenol nachweisen.

Wir sind heute noch nicht im Stande, die einzelnen Abarten der Proteïnkörper chemisch ganz genau zu charakterisiren. Bei unserer Unkenntniss der Molecularstructur und Moleculargrösse der Proteïnkörper müssen uns ihre gröberen chemischen und physikalischen Eigenschaften zu ihrer Charakterisirung dienen. Von diesem Standpunkte aus betrachtet müssen wir die elastische Substanz der Gefässe mit derjenigen des elastischen Bindegewebes für identisch erklären. Dafür sprechen folgende Thatsachen:

1. Ihre ziemliche Uebereinstimmung der procentualen Zusammensetzung.
2. Das Fehlen von Glutaminsäure und Asparaginsäure unter den Spaltungsproducten.
3. Dass bei der Spaltung mittelst gespannter Wasserdämpfe dieselben Producte entstehen wie bei der Verdauung und Spaltung des Nackenbandelastins mit Wasser, das eine Spur Salzsäure enthält.

Nachdem in Folge dieser Thatsachen die Identität der beiden Elastine anzunehmen ist und damit die Vermuthung Hammarsten's, es gäbe mehrere Elastine[4]), wenigstens für die elastische Substanz der Gefässe durch das Experiment nicht bestätigt wird, so sei im Folgenden von Elastin im Allgemeinen die Rede.

---

[1]) Wiener Akad. Sitzungsberichte, 1885, II. Abth.

[2]) Schützenberger: Annales de chimie et de physique (5) T. 16, S. 289.

[3]) Journ. f. pr. Chemie (2), 17, S. 71, 1878.

[4]) Physiologische Chemie, deutsche Ausgabe 1891, S. 30.

Bis zum heutigen Tage wird das Elastin in den meisten physiologisch-chemischen Lehrbüchern als ein schwefelfreier Körper beschrieben. Der Grund davon liegt in der Thatsache, dass bei der Reindarstellung der Substanz stets mit Kalilauge behandelt wurde, wodurch, wie oben gezeigt, die ganze Menge Schwefels abgespalten wird. Trotz der Angabe Chittenden und Hart's[1]), nach welcher dieselben in einem Präparate — sie substituiren dabei das Kochen mit 1 % Kalilauge durch Behandlung mit Essigsäure und Salzsäure — 0,3 Schwefel gefunden haben, ein Befund, den sie übrigens nicht mit Gewissheit dem Elastin zugeschrieben haben, wurde der Schwefelgehalt des Elastins allgemein in Frage gestellt. Da über die Reinheit meines Präparates in Folge der Darstellungsweise und der erhaltenen analytischen Resultate kein Zweifel bestehen kann, so zeigen vorliegende Untersuchungen entschieden, dass das Elastin als ein schwefelhaltiger Körper zu betrachten ist.

Abgesehen von einer Angabe Nencki's, nach welcher er Eiweissstoffe mancher Pilzarten[2]) frei von Schwefel gefunden hat, was ihn zur Aufstellung der Behauptung führte, dass für das lebendige Protoplasma der Schwefel kein nothwendiger Bestandtheil sei, so ist kein Proteïnkörper bekannt, welcher frei von Schwefel wäre.

Es ist eigenthümlich, dass unter den Spaltungsproducten des Elastins die nichthydroxylirten aromatischen Atomcomplexe in weit grösserer Zahl vertreten sind, als die hydroxylirten. Wie oben gezeigt wurde, betrug die Menge des Tyrosins — und die Abspaltung geschah in vorliegendem Falle so gut, wie quantitativ — 0,34 % der zersetzten Substanz. Andrerseits wurden neben Tyrosin 1,95 % Benzoësäure erhalten. Vergleicht man die Menge der den beiden aromatischen Atomcomplexen — nämlich den hydroxylirten und nichthydroxylirten — zu Grunde liegenden Benzolkerne, so gestaltet sich das Verhältniss wie 1 : 8,6. Nebenbei sei bemerkt, dass unter

[1]) L. c., S. 371 und 372.
[2]) Ber. d. d. chem. Ges., 1884, S. 2605.

den organischen Spaltungsproducten der Proteïnkörper die nichthydroxylirten Atomcomplexe die einzigen sind, welche sich heute durch Oxydation und Extraction mit Chloroform quantitativ bestimmen lassen. Letzteres Extractionsmittel ist dem Aether vorzuziehen, da es die bei der Oxydation des Tyrosins entstehende Paraoxybenzoësäure nicht gleichzeitig extrahirt.

Resultate:

1. Das Elastin aus der Aorta ist mit demjenigen aus dem Nackenbande identisch.
2. Das Elastin ist ein schwefelhaltiger Körper.
3. Die ganze Menge des Schwefels ist durch Kochen mit 1 % Kalilauge abspaltbar, ohne dass das Elastin hierbei seine Eigenschaften verliert.
4. Dieser Befund ist ein Beweis dafür, dass wenigstens der locker gebundene Schwefel ohne Zerfall des Proteïnmoleculs abspaltbar ist.
5. Bei der Spaltung mit überhitzten Wasserdämpfen liefert Elastin Hemielastin und Elastinpepton (bezw. nach Kühne's Terminologie Prot. und Deuteroelastose).
6. Beim Kochen mit Salzsäure entstehen NH_3, H_2S, Leucin, Glycocoll, Tyrosin, homologe Benzoësäuren, Lysatinin.
7. Die den beiden aromatischen Atomcomplexen zu Grunde liegenden Benzolkerne verhalten sich wie 1 : 8,6.
8. Beim Schmelzen mit Kali gibt es, unter anderen, folgende aromatische Atomkomplexe: Indol, Skatol, Benzol, Phenole.
9. Die Vermuthung Hammarsten's, es gäbe mehrere Elastine, wird, wenigstens für die elastische Substanz der Gefässe, welche ausser dem elastischen Binde-

gewebe das grösste Contingent des Elastins im Organismus stellt, durch das Experiment nicht bestätigt.

Zum Schlusse sei mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. F. Hoppe-Seyler, für die vielfachen Anregungen und Unterstützungen, die er mir während der Dauer dieser Arbeit zukommen liess, meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Ueber die Aufnahme der Nucleïne in den thierischen Organismus.

Von

Dr. Gumlich.

Assistent am physiologischen Institut in Berlin.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts zu Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 25. September 1893.)

Während die Bedeutung der Nucleïnstoffe für den Aufbau der Gewebe und für die in der Zelle verlaufenden wichtigsten chemischen Processe allgemein anerkannt wird, ist die Bedeutung der in der Nahrung zugeführten Nucleïnverbindungen für den Stoffwechsel noch völlig dunkel. Wir wissen nicht, ob dieselben sich überhaupt an dem Stoffwechsel betheiligen oder ob diese organischen Phosphorverbindungen für den Thierkörper verloren gehen. Durch die im hiesigen Laboratorium ausgeführten Versuche des Herrn Dr. Popoff[1]) ist erwiesen, dass im Darm ein sehr beträchtlicher Theil der Nucleïnstoffe in unzersetztem Zustand in Lösung übergeführt wird, es sind somit die Bedingungen für eine Resorption derselben gegeben; ob aber wirklich ein Eindringen in den Säftestrom stattfindet, kann nur durch Versuche am Organismus entschieden werden. Ich habe es daher, einem Vorschlage des Herrn Prof. Kossel folgend, übernommen, die Veränderungen des Stoffwechsels zu prüfen, welche sich nach Fütterung von Nucleïnsäure ergeben. Natürlich musste hierbei vor Allem das Verhalten der Phosphorsäure des Harns in Betracht kommen, welches einen sicheren Aufschluss darüber gibt, ob von diesen Stoffen etwas aufgenommen ist oder nicht. Neben dieser Hauptfrage drängen sich aber noch andere Gesichtspunkte auf. Nachdem A. Kossel die Basen der Harnsäure-Gruppe als Zersetzungsproducte der Nucleïne erkannt hatte,

---

[1]) Diese Versuche werden demnächst in dieser Zeitschrift publicirt werden (vergl. unten Seite 533).

konnte man auf die Vermuthung kommen, dass auch die Harnsäure aus den Nucleïnstoffen hervorgehe, und Horbaczewsky[1]) hat diesen bereits von Kossel und Stadthagen[2]) erörterten Gedanken verfolgt. Horbaczewsky führt als Beweise für diese Ansicht verschiedene Versuche an, welche den Uebergang von Nucleïnstoffen in Harnsäure darthun sollen. Unter diesen befinden sich auch Fütterungsversuche mit einem aus Milzpulpa dargestellten Nucleïnpräparat, welches bei Kaninchen und Menschen eine Vermehrung der Harnsäureausscheidung hervorrief. Diese Versuche standen in einem Widerspruch zu früheren Versuchen, welche Stadthagen[2]) an einem Hunde angestellt hatte, der nach Fütterung von Hefenucleïn keine Vermehrung der Harnsäureausscheidung erkennen liess. Es schien nun von Interesse zu sein, auch in diesem Falle auf das Auftreten von Harnsäure das Augenmerk zu richten.

Die für den Versuch dienende Nucleïnsäure wurde nach einem mir von Herrn Prof. A. Kossel angegebenen, später zu publicirenden Verfahren aus Thymusdrüsen des Kalbes dargestellt. Das Präparat ist frei von Eiweiss und Pepton und enthält im trockenen Zustand ungefähr 10 % Phosphor. Der zu Beginn des Versuchs 25,3 Kilo wiegende Hund erhielt während der elftägigen Versuchsperiode täglich 400 gr. geschabtes, fettfreies Rindfleisch, dazu am 8. Versuchstage 22 gr. Nucleïnsäure. Letztere wurde in gepulvertem Zustand in Gelatinekapseln verabreicht; der Hund zeigte nach dieser Gabe keine Spur von Unbehagen oder abnormen Erscheinungen, sodass eine Giftigkeit oder selbst eine Reizwirkung im Bereich des Verdauungstractus ausgeschlossen ist. Der durch Katheter entleerte Harn wurde nun vom 5. bis zum 11. Versuchstage auf folgende Bestandtheile untersucht:

1. Ich führte eine Bestimmung des Gesammtstickstoff-Gehaltes des Harnes nach der Kjeldahl'schen Methode aus. Ferner bestimmte ich mit Hilfe der von mir früher ausführlich angegebenen und geprüften Methoden die Menge des Stickstoffs, welcher in den durch Phosphorwolframsäure fäll-

[1]) Monatshefte für Chemie, 1889, S. 624; 1891, S. 221.

[2]) Virchow's Archiv, Bd. 109, S. 390.

baren Bestandtheilen des Harnes enthalten ist. Hieraus ergeben sich, unter Berücksichtigung des täglich bestimmten Ammoniakgehaltes, die in Columne 4 und 5 enthaltenen Werthe (s. Tabelle).

2. Die Phosphorsäure des Harns wurde mit Hilfe von Uranlösung titrimetrisch bestimmt. Da die Möglichkeit vorhanden war, dass ein Theil der Phosphorsäure, bezw. des Phosphors, im Harn in organischer Bindung ausgeschieden werde, so veraschte ich an jedem Versuchstage eine Probe des Harnes mit Soda und Salpeter und wiederholte in der Asche die Bestimmung der Phosphorsäure. Da die Resultate beider Bestimmungen genau übereinstimmten, so ist das Vorhandensein erheblicher Mengen schwerer zersetzlicher organischer Phosphorverbindungen ausgeschlossen.

3. Ich bestimmte die Menge der freien und der gepaarten Schwefelsäure nach Baumann.

4. Harnsäure und Kynurensäure wurden zusammen durch Fällung mit Salzsäure annähernd bestimmt[1]).

5. Der Harn wurde qualitativ geprüft auf Indicangehalt und auf Nucleïnbasen. Der Indicangehalt war während der ganzen Untersuchungsperiode ein geringer und zeigte keine auffallenden Veränderungen; bei Zusatz von ammoniakalischer Silberlösung entstand kein nennenswerther Niederschlag, so dass wesentliche Mengen von Nucleïnbasen nicht nachweisbar waren.

Bezüglich der Harnsäure stimmt mein Befund mit dem Stadthagen's überein. Selbstverständlich gilt dies Resultat vorläufig nur für die von Stadthagen und mir gewählten Versuchsbedingungen. In Anbetracht der Thatsache, dass die Nucleïnsäuren als eine grosse Gruppe verschiedenartiger Verbindungen zu betrachten sind, und in Erwägung des ungleichen Verhaltens der Säugethiere bezüglich der Bildung von Harnsäure, darf man unsere negativen Erfolge nicht als Beweise gegen die Bildung der Harnsäure aus Nucleïn betrachten.

---

[1]) Nach Eingabe einer so beträchtlichen Menge von Nucleïnsäure glaubte ich auch eine bedeutende Vermehrung der Harnsäure-Ausscheidung erwarten zu dürfen, wenn diese Nucleïnsäure eine Vorstufe der Harnsäure ist. Ich habe mich daher mit der Salzsäurefällung begnügt.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
Versuchstag.	Kilo Körp.-Gewicht am Ende des Tages.	Gesammt-N des Harnes pro die in gr.	Harnstoff-N in Proc. des Gesammt-N.	Extractiv-N in Proc. des Gesammt-N.	NH_3 pro die in gr.	P_2O_5 pro die in gr.	H_2SO_4 pro die in gr.	Verhältniss der nichtgepaarten zur gepaarten H_2SO_4 (A : B).	Harnsäure + Kynurensäure pro die in gr.	Wasseraufnahme pro die cbcm.	Spec. Gewicht des Harnes nach Verdünnung auf 1000 cbcm.	Bemerkungen.
5.	25,3	15,262	91 %	6,3 %	0,510	1,65	2,695	22,9 : 1	—	—	1018	Am 3. Versuchstage Defäcation.
6.	25,21	13,471	90,3 »	7,6 »	0,340	1,50	2,435	21,4 : 1	0,3135	200	1017	—
7.	25,2	12,789	90,0 »	7,8 »	0,3995	1,50	2,158	17,7 : 1	0,3120	400	1015	—
8. 22,0 gr. Nucleïnsäure verabreicht.	25,5	14,437	88,3 »	8,1 »	0,612	3,34	2,637	21,4 : 1	0,310	350	1020	—
9.	25,0	13,187	87,0 »	8,8 »	0,6545	2,00	2,643	12,3 : 1	0,3130	400	1016	Defäcation.
10.	25,0	13,045	88.8 »	7,7 »	0,527	1,67	3,273	22,2 : 1	—	400	1026	—
11.	24,82	11,737	—	—	0,612	1,40	1,918	15,6 : 1	0,3032	300	1013	Defäcation.

Die Tabelle ergibt keine bemerkenswerthe Veränderung in der Ausscheidung des Gesammtstickstoffs, hingegen eine allmälige relative Steigerung des Stickstoffs der Extractivstoffe. Diese Vermehrung hängt wahrscheinlich mit der Abnahme des Körpergewichts des Versuchsthieres zusammen, wie ich früher dargethan habe.

Unzweifelhaft tritt eine beträchtliche Vermehrung der Phosphorsäureausscheidung an dem Nucleïnsäuretage und an dem darauf folgenden Tage hervor, sogar noch am dritten Tage ist eine dritte, freilich etwas zweifelhafte Vermehrung der Phosphorsäure erkennbar. Der Ueberschuss von P_2O_5 betrug insgesammt nach der Nucleïnsäurefütterung ungefähr 2,5 gr.; in der verfütterten Nucleïnsäure, welche nur oberflächlich getrocknet war, dürfen kaum 4 gr. P_2O_5 angenommen werden; nach dieser Schätzung würde mehr als die Hälfte des Nucleïnsäure-Phosphors im Harn wiedergefunden sein. Die Excremente konnten leider aus zufälligen Gründen nicht untersucht werden.

Jedenfalls beweist mein Versuch, dass eine Aufnahme des in der Nucleïnsäure verfütterten Phosphors stattgefunden hat. Da die Nucleïnsäure als solche gelöst im Chymus nachzuweisen ist, so muss man annehmen, dass die von mir beobachtete Vermehrung der Phosphorausscheidung, nicht auf die Resorption von der aus zersetzter Nucleïnsäure hervorgehenden Phosphorsäure, sondern von der Nucleïnsäure selbst zurückzuführen ist. Auch dürfte die Thatsache, dass es möglich ist, den thierischen Organismus durch Eingabe von Nucleïnsäure oder von nucleïnhaltigem Gewebe (Thymus) Phosphor in Nucleïnverbindungen zuzuführen, ein praktisches Interesse beanspruchen.

Zum Schlusse sei es mir noch gestattet, Herrn Prof. Kossel für die Anregung und für die Theilnahme bei dieser Arbeit meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Vergleichende Untersuchungen über den Chemismus im Herz- und Körpermuskel.

Von

Dr. Heinrich Boruttau,
Assistenten am physiolog. Institut zu Göttingen.

(Der Redaction zugegangen am 30. September 1893.)

Die heutigen Anschauungen über den Chemismus des arbeitenden und ruhenden Muskels knüpfen sich in ihren wichtigsten Punkten an Untersuchungen über die Kohlehydrate und die Säuren des Muskels.

Zu den ersteren zählen, so weit sie hierbei in Betracht kommen, Glykogen, Dextrin und Zucker; unklar bleibt nach wie vor die Stellung und Rolle des Inosits, welchem nach Maquenne's Forschungen eine ringförmige, den Benzolderivaten nahestehende Constitution zukommt.

Was das Glykogen anbetrifft, so gibt schon O. Nasse[1]) an, dass Muskeln nach der Arbeit weniger Glykogen enthalten, als geruhte, aber auf Grund von Bestimmungsmethoden, welche er selbst später für unzuverlässig erklärte. Später gelang mittelst Brücke's Bestimmungsmethode dessen Schüler Weiss[2]) der Nachweis, dass tetanisirte Froschmuskeln weniger Glykogen enthalten als geruhte.

---

1) Pflüger's Arch., Bd. II, 1869, S. 97.

2) Sitzungsber. der Wiener Akad., math.-naturw. Kl., c 1, Juli 1871, S. 64.

Diese Thatsache ist weiterhin vielfach bestätigt worden, und zwar am Kaltblüter- wie am Warmblütermuskel, am ausgeschnittenen und überlebend gereizten, wie an dem des lebenden Thieres, so von: Molinari[1]), Külz und seinen Schülern[2]), ganz neuerdings noch von Morat und Dufourt[3]).

Von mehreren Forschern (Ranke, Nasse, Molinari) wurde gleichzeitig mit der Abnahme des Glykogens eine Zunahme des Zuckers constatirt.

Es leuchtet ein, dass bei der verschiedenen Function und Inanspruchnahme der verschiedenen Muskeln des Organismus quantitative und vielleicht auch qualitative Unterschiede im Chemismus derselben vorhanden sein müssen.

Dies gilt nicht nur für die Hauptgruppen der glatten und quergestreiften Muskeln, sondern auch für die einzelnen Muskeln und Muskelgruppen innerhalb jener. Schon Nasse[4]) gab an, dass nicht nur die Muskeln verschiedener Thiere, sondern auch die verschiedenen Muskeln desselben Thieres bedeutende Unterschiede im Glykogengehalt zeigen.

Eine besondere Stellung im System nimmt nun der Herzmuskel ein, sowohl nach seiner Function, als nach seinem histologischen Aufbau. Er ermüdet nie, oder vielleicht besser: er gleicht die von der systolischen Arbeit herrührende Ermüdung in der Diastole und Pause wieder aus und setzt so seine rhythmische Thätigkeit ohne Unterbrechung fort bis ans Ende des Lebens.

Dass diesem Verhalten auch besondere Eigenthümlichkeiten in seinem Chemismus zu Grunde liegen, ist wahrscheinlich. Ich habe versucht, etwas Genaueres darüber in Erfahrung zu bringen, und theile die Versuche und Versuchsergebnisse in Folgendem mit.

Aus dem besprochenen Verhalten des Herzens folgt ohne weiteres, dass die vergleichende Analyse, wie sie von den

---

[1]) Annali di chim. e farm. IX, S. 351—66.

[2]) Z. B. Manché, Zeitschr. für Biologie, Bd. XXV, S. 163.

[3]) Sur la consommation du glycogène des muscles pendant l'activité de ces organes, Archives de physiol., IV, S. 457, 1891.

[4]) Pflüger's Arch., Bd. XIV, S. 473.

Autoren beim ruhenden und arbeitenden Körpermuskel ausgeführt wurde, hier unmöglich ist. Es setzt vielmehr die Frage ein, wie weit man aus den chemischen Vorgängen in einem Organ nach dem Tode auf den Chemismus während des Lebens schliessen darf.

Eine chemische Leistungsfähigkeit überlebender Drüsenzellen ist vielfach festgestellt. So haben Pflüger und Kochs angegeben, dass nicht nur nach dem Vorgange von Bunge und Schmiedeberg künstlich mit Blut durchströmte Nieren, sondern auch ein Brei zerhackter und mit Blut angerührter Leber- oder Nierensubstanz Benzoësäure und Glycocoll zu Hippursäure, Phenol und Schwefelsäure zu Phenol-Aetherschwefelsäure zu paaren vermöge. Der raschen Umwandlung des Leberglykogens in Zucker nach dem Tode entspricht nach der Ansicht der Mehrzahl der Forscher eine beständige Bildung und Wiederverzuckerung des Glykogens im Leben. Beim Muskel handelt es sich darum, erstens ob ähnlich wie bei der Leber nach dem Tode das Glykogen schwindet, zweitens ob dieser Glykogenschwund nach dem Tode demjenigen im Leben bei der Arbeit analog ist.

Während Nasse[1]) angibt, dass mit dem Eintritt der Starre das Muskelglykogen sich vermindert, bis zum völligen Verschwinden, schoben andere Autoren diesen Vorgang auf beginnende Fäulniss, und Böhm[2]) stellt das Verschwinden des Muskelglykogens nach dem Tode, selbst nach Eintritt der Starre, ganz in Abrede. Cramer[3]), welcher die Bestimmungsmethode von R. Külz anwandte, fand eine bedeutende Herabsetzung des Glykogengehalts (z. B. von 0,2 bis 0,04 $^0/_0$, also um $^4/_5$) dann, wenn die Muskeln mehrere Stunden lang einer Temperatur von 40^0 ausgesetzt worden waren.

Ich habe nun das Verhalten des Glykogens nach dem Tode im Körpermuskel und Herzmuskel vergleichend untersucht, indem ich beide Organe desselben Thieres unmittelbar

---

1) A. a. O.
2) Pflüger's Arch., Bd. XXIII, S. 52.
3) Zeitschr. für Biologie, XXIV, S, 67.

nach dem Tode, sowie nach Ablauf einiger Zeit, analysirte, unter genauer Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen.

Man findet allgemein die Angabe, der Herzmuskel enthalte weniger Glykogen als der Körpermuskel. Sieht man die Zahlenangaben an, so findet man aber hierbei grössere Schwankungen, als bei allen sonstigen Analysen von Muskelglykogen. Weiss[1]) fand $^2/_3$ als Verhältniss des Herzmuskel- zum Körpermuskelglykogen. Mc. Donnel und Wittich geben Fehlen des Glykogens im Herzen von Neugeborenen an. Cramer[2]) stellt den Procentgehalt an Glykogen, den er in Körpermuskulatur und Herz dreier menschlicher Neugeborenen fand, folgendermassen zusammen:

	K.-M.	Herz.
I . .	1,85,	0,12,
II . .	0,87,	0,002,
III . .	1,22,	0,25.

Den Tabellen desselben Autors entnehme ich die Angabe des Glykogengehalts zweier Kalbsherzen: 0,16 und 0,03 %. Dies vorausgeschickt, gehe ich zur genauen Schilderung meiner Versuche über.

Soeben getödteten Hunden wurde, so schnell es anging, das Herz und ungefähr das gleiche Gewicht Extremitätenmuskulatur (Mm. adductores femor.) entnommen und in je zwei Hälften getheilt. Da Cramer angibt, dass der Glykogengehalt verschiedener Theile desselben Herzens ein verschiedener sei, so wurde das Herz so zerschnitten, dass sowohl jeder Vorhof als jede Kammer, sowie auch das Septum in je zwei möglichst gleiche Hälften zerfielen, so dass jede Gesammthälfte die Hälfte des ganzen linken und die Hälfte des ganzen rechten Herzens enthielt.

Hierauf wurde möglichst rasch gewogen und die eine Hälfte von Herz- sowohl als Adductorenmuskel sofort, die andere nach 24—36stündigem Liegen bei gewöhnlicher Temperatur, in siedendes Wasser gebracht, zerschnitten, längere

---

1) A. a. O.
2) A. a. O.

Zeit im Sieden erhalten, colirt, und dieser Extractionsmodus dreimal wiederholt. Die vereinigten Auszüge wurden eingeengt und mit Alkohol gefällt. Die alkoholischen Filtrate dienten zur Zuckerbestimmung. Die Niederschläge wurden wieder in heisses Wasser eingetragen und mit Brücke's Reagentien weiter behandelt. Die Rückstände von der Extraction mit siedendem Wasser wurden unter genauer Befolgung der Vorschriften von R. Külz[1]) mit Kalilauge behandelt, die Lösung neutralisirt und mit Brücke's Reagentien gefällt. Die so aus Extract und Rückstand erhaltenen Glykogenlösungen wurden vereinigt, mit Alkohol gefällt, das abfiltrirte Glykogen zur Reinigung nochmals gelöst, eiweissfrei gemacht, wieder gefällt, getrocknet und gewogen[2]).

Eine ausführliche Zusammenstellung der Resultate findet sich in den beigegebenen Tabellen. Aus ihnen folgt, dass unter gleichen Versuchsbedingungen das Glykogen des Herzmuskels nach dem Tode wesentlich rascher schwindet, als dasjenige des Extremitätenmuskels.

Bei Versuch 1 und 2 gelangten die Organe erst $1\frac{1}{2}$ bez. $\frac{1}{2}$ Stunde p. m. zur Verarbeitung. Zu dieser Zeit ist der Procentgehalt des Herzmuskels an Glykogen bereits ein niedriger; er verschwindet bei 1 im Laufe von 36 Stunden gänzlich, während er bei 2 um $\frac{3}{4}$ abnimmt. Der Gehalt der Adductorenmuskulatur dagegen erleidet während dieser Zeit nur eine minimale Verminderung.

Bei Versuch 3 und 4 wurde das Herz dem eben getödteten Thier viel eiliger entnommen, noch pulsirend zerschnitten und die eine Hälfte in siedendes Wasser gebracht. Ferner wurden die zweiten Portionen von beiden Muskelarten mit defibrinirtem Blut versetzt stehen gelassen, um die etwaige Wirkung eines grösseren Blutgehalts des Herzmuskels auszugleichen. Bei 3 waren die Portionen einfach damit übergossen, bei 4 zerhackt und mit wenig Blut innig gemengt.

---

1) Zeitschr. f. Biologie, XXII, S. 161.

2) Vergl. Hoppe-Seyler, Handbuch der physiol.-chem. Analyse, 6. Aufl., S. 497.

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Organ.	Gewicht der verwend. Subst.	Glykogen aschefr. in gr.	Desgl. in %	Abnahme in %
1	Körpermuskel 1 1/2 Std. nach dem Tod K_1	189 gr.	2,9971	1,585	1.4
	Körpermuskel nach 38 Std. K_2	189 gr.	2,9525	1,562	
	Herzmuskel 1 1/2 Std. nach dem Tod H_1	168 gr.	0,2254	0,134	100,0
	Herzmuskel nach 36 Std. H_2	140 gr.	0	0	
2.	Körpermuskel 1/2 nach dem Tode K_1 . .	52 gr.	0,2714	0,520	0,2
	Körpermuskel nach 24 Std. K_2	49 gr.	0,2543	0,519	
	Herzmuskel 1/2 Std. nach dem Tode H_1	37,5 gr.	0,0605	0,188	73,9
	Herzmuskel nach 24 Std. H_2	34 gr.	0,0165	0,049	

Tabelle II.

Versuchs-Nr.	Organ.	Gewicht der verwend. Subst.	Glykogen aschefr. in gr.	Desgl. in %	Abnahme in %
3.	Körpermuskel 10 Min. nach dem Tode K_1	100 gr.	0,2516	0,252	11,1
	Körpermuskel nach 24 Std. K_2	100 gr.	0,2242	0,224	
	Herzmuskel noch schlagend H_1	70 gr.	0,1741	0,249	23,9
	Herzmuskel nach 24 Std. H_2	65 gr.	0,1238	0,190	
4.	Körpermuskel 5 Min. nach dem Tode K_1	50 gr.	0,2930	0,586	9,7
	Körpermuskel nach 24 Std. K_2[1])	43 gr.	0,2272	0,529	
	Herzmuskel, noch schlagend H_1	50 gr.	0,2658	0,532	100,0
	Herzmuskel nach 24 Std. H_2[1])	42 gr.	0	0	

Tabelle III.

Versuchs-Nr	2 cbcm. Fehling'sche Lösung erfordern zur Reduction:			
1.	Von K_1 20,	von K_2 16,	von H_1 6,	von H_2 3 cbcm..
2.	» » 17,5,	» » 16,	» » 15,	» » 12,5 »
3.	» » 16,	» » 15,5	» » 10,	» » 8 »
4.	» » 16,	» » 10,	» » 10,	» » 3,5 »

des mit der verwandten Substanz gleichwerthigen Alkoholextractes.

[1]) Zerhackt und mit defibrinirtem Blut digerirt.

In beiden Fällen ist der Glykogenschwund der Adductorenmuskulatur etwas grösser als bei 1 und 2, doch viel geringer als derjenige des Herzens, welcher bei 3 zwar nur $^1/_4$, bei 4 aber ein totaler ist.

Die Alkoholextracte habe ich nach Abdestilliren des Alkohols ohne Weiteres mit Fehling'scher Lösung titrirt: freilich erhält man so die Summe der darin vorhandenen reducirenden Substanzen, nicht den Zucker allein, immerhin ist die bedeutendere Zunahme des Reductionsvermögens beim Herzen nach dem Liegen, gegenüber dem Adductorenmuskel, wohl darauf zu beziehen, dass aus dem geschwundenen Glykogen wenigstens theilweise Zucker entstanden ist. Die neuerdings von Panormoff[1]) angewandte Methode der quantitativen Zuckerbestimmung mittelst Phenylhydrazin habe ich nicht versucht, wohl aber an Portionen der Extracte die Phenylhydrazinprobe nach E. Fischer und R. v. Jaksch angestellt: nur aus den Extracten der zweiten Herzportionen erhielt ich ziemlich regelmässig charakteristische Gruppen von mikroskopischen Phenylglukosazonkrystallen.

Ich weise noch besonders darauf hin (siehe die Tabelle), dass in Versuch 3 und 4 der Glykogengehalt des ganz frischen Herzmuskels nahezu ebenso gross ist, wie derjenige des Körpermuskels.

Ich glaube daher, dass bisher der Glykogengehalt des Herzmuskels deshalb kleiner gefunden wurde, weil die Verarbeitung nicht genügend früh begonnen wurde, und dass die bedeutenden Schwankungen in der Verschiedenheit der Zeitpunkte der Inangriffnahme ihren Grund haben. Ich hatte versucht, Bestimmungen an den Organen des Pferdes zu machen; hier ist jedoch das Unternehmen, das Herz möglichst rasch nach dem Tode zu verarbeiten, naturgemäss erschwert, ebenso die Zuckerbestimmung durch die starke Färbung der Extracte behindert, so dass ich die Versuche an diesem Thier aufgab, nachdem eine Bestimmung ergeben hatte: für das linke Herz 0,132 $^0/_0$, für das rechte 0,251 $^0/_0$, dagegen für den

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1893.

Pektoralmuskel 2,690 %. Dieser hohe Werth stimmt gut mit den Angaben Niebel's, welcher den ausserordentlich grossen Glykogengehalt des Pferdefleisches betont und für die Erkennung desselben bei Verfälschungen zu benutzen vorgeschlagen hat.

Während die Autoren die zweiten Muskelportionen nach Ablauf der beabsichtigten Zeit überhaupt erst der Thierleiche entnahmen, habe ich auch die Adductorenmuskulatur, welche liegen bleiben sollte, sofort entnommen, da ich, schon um es zu halbiren, das ganze Herz selbstverständlich sofort entnehmen musste. Auch habe ich so die Starre ausser Acht gelassen. Ich hielt mich hierzu für berechtigt, da die Ansichten über ihr Wesen und ihr Verhältniss zur lebendigen Contraction noch streitig sind und eine Beziehung des Glykogenschwundes nach dem Tode zur Starre nicht bewiesen ist.

Der rasche Glykogenschwund im Herzmuskel zeigt eine Analogie mit dem Verhalten der Leber. Aus letzterem Organ hat man ein Enzym darzustellen versucht, welches Glykogen in Zucker zu verwandeln im Stande ist. Jedenfalls vermag Lebersubstanz auch zugesetzte Glykogenlösung zu saccharificiren.

Solche Versuche sind zuerst von v. Wittich[1]) auch mit Muskelsubstanz angestellt worden. Er setzte einprocentige Glykogenlösungen mit frischen Stücken verschiedener Organe: Haut, Niere, Darmwand, Muskel, in Reagensgläsern an. Es wurde bald Aufhellung der zuvor opalisirenden Lösung und Auftreten von Zucker durch die Reductionsprobe constatirt. «Auffällig war es dabei, dass frische Muskeln in Glykogenlösung eingebettet am allerlangsamsten wirkten, erst nach mehrstündigem Stehen begann eine Aufklärung und Reductionsfähigkeit der Lösung, während andererseits der Muskel auffallend lange seine Contractionsfähigkeit behielt, und, wenn häufig tetanisirt, den Umsatz des Glykogens förderte.» Hier fällt also Licht auf den zweiten oben erwähnten Punkt; es zeigt sich eine Beziehung des Chemismus des überlebenden Muskels zur Arbeitsfunction.

---

[1]) Hermann's Handbuch, V, S. 382.

Auch Seegen[1]) brachte Muskelsubstanz mit Glykogenlösung zusammen und fügte Blut hinzu, welches er durch Hindurchleiten von Luft arteriell erhielt. Dabei fand eine theilweise Umwandlung von Glykogen in Zucker statt, und zwar in viel höherem Grade durch Muskel, als durch Blut allein. Wie schon oben betont, zeigt sich auch in meinen Analysen die geringe Einwirkung des Blutgehalts auf den Glykogenschwund.

Auch die erwähnte Methode habe ich nun zur Vergleichung von Herzmuskel und Körpermuskel angewandt.

Gleiche Gewichtsportionen von beiden wurden gehackt und mit gleichen Mengen einprocentiger Glykogenlösung bei 40° digerirt. Nach $^1/_2$ bis 1 Stunde klärten sich die Flüssigkeiten, und in der That verschwand die Jodreaction des Glykogens unter der Wirkung des Herzmuskels eher als beim Körpermuskel. Täuschung durch Jodbindung habe ich durch besondere Vorsichtsmassregeln möglichst auszuschliessen gesucht; auch habe ich durch die Reductionsprobe nachgewiesen, dass das Auftreten von Zucker unter der Wirkung des Herzfleisches schneller stattfindet. Die Methode wurde ausgedehnt auf die Organe von Katze, Hund und Rind mit dem angeführten positiven Ergebniss; Versuche mit Herz- und Körpermuskel vom Kaninchen führten zu keinem Resultat.

Dass Eiweisslösungen in ausgedehnterem Masse die Fähigkeit zukommt, Glykogen in Zucker zu verwandeln, ist mehrfach festgestellt. Der Unterschied in der Wirkung von Herz- und Körpermuskel auf zugesetztes Glykogen, welcher sich in meinen Versuchen zeigte, kann indessen nur durch eine den Organen eigenthümliche Action erklärt werden. Es lag nahe, zu untersuchen, ob diese sich an Bestandtheile der Muskeln knüpft, welche durch Wasser extrahirbar sind, oder ob an die darin unlöslichen Bestandtheile der Muskelfasern.

Zu diesem Zwecke habe ich die Muskelsubstanz mit Wasser von 40° mehrmals extrahirt und möglichst stark ausgepresst. Die glykogenumwandelnde Wirkung war am Extracte aufs Deutlichste vorhanden, während der trockene

---

[1]) Centralbl. f. d. med. Wissensch., 1887, S. 356, 386.

Muskelrückstand sie fast ganz verloren hatte. Herzmuskelextracte von gleicher Concentration wirkten rascher als Körpermuskelextracte. Siedehitze hob die Wirksamkeit der Extracte fast ganz auf. Endlich wurde, um der Natur des enzymartigen Körpers noch näher zu kommen, das Extract mit Alkohol gefällt und schleunig mittelst der Luftpumpe filtrirt. Der Rückstand, in Wasser aufgeschwemmt, zeigte auch noch eine saccharificirende Wirkung, doch viel schwächer, so dass ich auf diesen letzten Versuch nicht zu viel Nachdruck legen möchte, obschon er zweimal mit dem gleichen Ergebniss angestellt wurde. Es ist jedenfalls wahrscheinlich, dass ein wasserlöslicher, eiweissartiger Körper im Muskel vorhanden ist, welcher Glykogen in Zucker verwandelt, und dass dieser im Herzmuskel in grösserer Menge oder stärker wirkend vorhanden ist, als in den andern Muskeln.

Es ist neuerdings von S. Fränkel[1]) die Vermuthung ausgesprochen worden, dass das Glykogen in den Zellen des lebenden Organismus nicht frei, sondern an Eiweiss gebunden vorhanden sei. Diese Annahme entspricht den neueren Theorien über die chemischen Processe im Thierkörper. L. Hermann hat zuerst[2]) auf Grund der Thatsache, dass ein Muskel, welcher keinen auspumpbaren Sauerstoff mehr besitzt, noch arbeiten kann, betont, dass der chemische Process, welcher dabei stattfindet, keine gewöhnliche Oxydation sein könne, vielmehr eine Spaltung sein müsse. Die von ihm so bezeichnete, hypothetische «inogene Substanz» muss verbrennbaren Kohlenstoff, aber auch Sauerstoff enthalten, und enthält vielleicht auch einen eiweissartigen Atomcomplex.

Dieser Gedanke ist weiterhin vielfach ausgeführt worden, so von Pflüger[3]) und Ehrlich[4]), welcher letztere ein Schema des leistungsfähigen und regenerirbaren Protoplasmamolecüls aufgestellt hat: dasselbe besteht aus dem «Leistungskern», den «oxydirbaren Seitenketten» und dem «intramoleculären

---

[1]) Pflüger's Arch., Bd. LII, S. 125.

[2]) Untersuchungen über den Stoffwechsel der Muskel, Berl. 1867.

[3]) Pflüger's Arch., Bd. X, S. 251.

[4]) Das Sauerstoffbedürfniss des Organismus, Berlin 1888.

Sauerstoff». Die Verbrennung, welche Energie freiwerden lässt, ist eine Abspaltung der oxydirten Seitenketten, welcher die «Regeneration» durch Aufnahme neuer oxydirbarer, sowie von Sauerstoff in das Molecül nachfolgt.

Auf einem ähnlichen Vorgange abwechselnder intramolecularer Oxydation beruhen wahrscheinlich, wie Hoppe-Seyler schon sehr lange angegeben hat, viele Wirkungen, welche durch Enzyme hervorgebracht werden. Da man die Wirkungen der (protoplasmatischen, «organisirten» Fermente) mit Hoppe-Seyler ebenso erklärt, so redet man jetzt wohl kurzweg von der «Fermenttheorie».

Dass der Körper, welcher die Umwandlung des Glykogens in Zucker (und vielleicht dessen weitere Oxydation) bewirkt, eiweissartiger Natur ist, wurde oben als wahrscheinlich bezeichnet. Ob eine Verbindung des Glykogens mit demselben erst hierbei eintritt, oder das Glykogen schon durch eine solche entsteht und dieselbe im lebenden Organismus dauernd statt hat und nur durch unsere Darstellungsmethoden gelöst wird, ist wohl nicht leicht zu entscheiden.

Ich fasse schliesslich die thatsächlichen Ergebnisse meiner Versuche zusammen:

1. Der Glykogengehalt des Herzmuskels vermindert sich nach dem Tode unter den gleichen Bedingungen rascher, bez. in höherem Maasse, als derjenige des Körpermuskels.
2. Der Herzmuskel, bez. sein wässeriges Extract, verwandelt zugesetztes Glykogen unter den gleichen Bedingungen schneller in Zucker, als der Körpermuskel, bez. dessen Extract.
3. Der Glykogengehalt des lebendfrischen Herzmuskels dürfte demjenigen des Adductormuskels ungefähr gleichkommen.

Nimmt man an, dass der lebende, thätige Herzmuskel ein gleiches Verhalten zeigt, wie der «überlebende», und sucht man nach einer Beziehung zu der Eingangs erwähnten functionellen Eigenschaft dieses Organs, so könnte man die gefundene Thatsache so erklären, dass mit der beständigen rhythmischen Thätigkeit ein besonders rascher Glykogenverbrauch, und

vielleicht mit der diastolischen Erholung eine entsprechende Neuaufnahme verbunden ist.

Der Inosit ist in rein chemischer Hinsicht von Maquenne sehr genau studirt worden; ziemlich gleichzeitig hat R. Fick zahlreiche Pflanzen auf sein Vorkommen geprüft und das Verhalten des Inosits gegenüber verdünnten Säuren und Enzymen untersucht, ohne dass sich irgend welche Einwirkung gezeigt hätte. Diese, schon seit seiner Entdeckung bekannte Unveränderlichkeit lässt Versuche über den Inosit in der Art, wie die beschriebenen über das Glykogen als aussichtslos erscheinen. Dazu kommt, dass sich die Darstellungsmethode von Boedeker für quantitative Bestimmungen nicht wohl eignet, vor allem aber der geringe Gehalt im Muskel. Derselbe ist nur im Herzfleisch etwas beträchtlicher, während die Angaben der Autoren über das Vorkommen des Inosits im Körpermuskel verschieden lauten. Ich habe aus 0,5 kg. Pferdeherz wägbare Mengen erhalten, während das Körpermuskelfleisch Spuren ergab, an denen eben noch eine deutliche positive Scherer'sche Reaction sich anstellen liess.

Beim Digeriren von Inositlösung mit Muskelsubstanz trat nicht die geringste Veränderung ein, ebensowenig wie bei einer Wiederholung der Versuche von R. Fick: längeres Sieden mit verdünnter Schwefelsäure, sowie Versetzen mit Speichel oder Diastase. Die physiologische Bedeutung des Inosits bleibt nach wie vor ein Räthsel.

Was die Säurebildung im Muskel — abgesehen von der gasförmigen Kohlensäure — anbelangt, so gilt als grundlegend die Beobachtung von du Bois-Reymond, dass der frische Froschmuskel neutral, der tetanisirte, wie der todtenstarre sauer — auf Lakmus — reagirt. Neuerdings gibt Heffter[1]) an, dass im Milchsäuregehalt kein Unterschied zwischen ruhendem und arbeitendem Muskel bestehe. Ueber den Herzmuskel existiren Angaben, dass er auch in ganz frischem Zustand sauer reagire. Jedenfalls bedarf auch dies Gebiet, insbesondere der Vergleich der Säurebildung in Herz- und Körpermuskel einer weiteren Bearbeitung.

[1]) Arch. f. exper. Pathol. und Pharmakol., 1893, S. 225.

Ueber eine im Hühnereiweiss in reichlicher Menge vorkommende Mucinsubstanz.

Von

Carl Th. Mörner in Upsala.

(Der Redaction zugegangen am 8. October 1893).

Als ich beim Studiren der im Hühnereiweiss befindlichen Zuckerart das Filtrat nach der Coagulirung des Eiweiss in Wärme mit Essigsäurezusatz stark concentrirte, wurde ich dadurch überrascht, einen ansehnlichen, der Consistenz nach gelatinösen, in Wasser unlöslichen Rückstand zu finden, während ich eine syrupöse, in Wasser lösliche Masse aus Salzen, Zucker und übrigen etwaig befindlichen Extractivstoffen erwartete. Durch das völlig negative Resultat der Prüfung mit Heller's Probe erwies sich nämlich die Flüssigkeit von den wohlbekannten Eiweisskörpern des Hühnereiweiss, Ovalbumin und Globulin, ganz befreit, und andere Bestandtheile des Hühnereiweiss waren mir nicht bekannt als einerseits die erwähnten beiden Eiweisskörper, andererseits Salze und Extractivstoffe, da einige kurzgefasste Angaben, die Neumeister in Betreff einer im Hühnereiweiss befindlichen Substanz, dem Pseudopepton, und die mehr versteckt in seiner

[1]) R. Neumeister: «Zur Physiologie der Eiweissresorption und zur Lehre von den Peptonen». Zeitschr. f. Biologie, N. F., Bd. 9, S. 369, 1890.

Abhandlung über die Resorption des Peptons eingeschoben worden war, bisher meiner Aufmerksamkeit entgangen.

Obgleich ein leicht erreichbares Untersuchungsmaterial und auch fleissig untersucht, hat man dem Hühnereiweiss bis in jüngster Zeit keine anderen Proteïnstoffe zugeschrieben, als die typischen Eiweisskörper der Albumin- und Globulin-Gruppe. Ausser einer Angabe von Corin und Berard[1]) über das Vorkommen von «Pepton» im Hühnereiweiss, eine Angabe, die sich auf keine nähere Untersuchung der Natur des betreffenden «Pepton» stützt, ist Neumeister der erste, welcher eine von den früher bekannten getrennte Proteïnsubstanz, die er unter der Benennung «Pseudopepton» zur Gruppe der Eiweisskörper führt, aus dem Hühnereiweiss isolirte und rücksichtlich der wichtigsten, qualitativen Reactionen beschrieb.

Dieser Auffassung beizustimmen ist mir aber unmöglich, nachdem aus meinen zahlreichen Versuchen mit Bestimmtheit hervorgegangen, dass die betreffende Substanz, Neumeister's Pseudopepton, zu den Mucinsubstanzen hinzuführen ist, näher bestimmt zu der Gruppe der *mukoïden* Substanzen. Am geeignetsten dürfte diese Substanz unter der Benennung *Ovomukoïd* auftreten. Nachdem man vermittelst Coagulirung in Wärme unter passendem Essigsäurezusatz und darauf folgender Filtrirung alles coagulabele Eiweiss (völlig negativer Ausfall von Heller's Probe) aus dem mit einigen Volumen Wasser verdünntem Hühnereiweiss gänzlich entfernt hat, kann man verschiedene Wege einschlagen zur Isolirung des im Filtrat befindlichen Ovomukoïds.

Neumeister bereitete sein Pseudopepton (= Ovomukoïd), indem er das Filtrat mit Ammoniumsulphat sättigte, nach der Auspressung den entstandenen Niederschlag in etwas Wasser löste, und nach anhaltender Dialyse der erhaltenen Lösung dieselbe mit Alkohol unter Erwärmung niederschlug. Nach diesem Verfahren ist auch mein Präparat Nr. 6 hergestellt.

---

[1]) Travaux du laboratoire Léon Frédéric, Université de Liège. Institut de physiologie, Vol. 2, p. 170.

Im Uebrigen wurden folgende verschiedene Herstellungsmethoden von mir angewendet:

2. Das Filtrat wurde mässig concentrirt, mit Alkohol niedergeschlagen, der Niederschlag ausgepresst, in Wasser gelöst und wieder mit Alkohol niedergeschlagen, was noch 2 Mal wiederholt wurde. Präparat Nr 2.

3. Das Filtrat wurde bis zur Trockenheit concentrirt; der lamellöse Rest unter anhaltender Decantirung mit destillirtem Wasser während einiger Tage ausgewaschen, wobei die Lamellen bedeutend anschwollen. Behandlung mit Alkohol. Präp. Nr. 1 u. 3.

4. Das Filtrat wurde durch Sättigung mit Natriumsulphat in Wärme niedergeschlagen. Die zusammengebackene, schwammig poröse, niedergeschlagene Masse wurde ausgepresst und in kochendem Wasser aufgelöst; die Lösung wurde wieder mit Natriumsulphat in Wärme niedergeschlagen, welche Procedur noch ein Mal (Präparat Nr. 4) oder zwei Mal (Präparat Nr. 5) wiederholt wurde, wonach der zuletzt erhaltene Niederschlag mit dest. Wasser fleissig decantirt und schliesslich alkoholextrahirt wurde.

Das Ovomukoïd tritt in zwei verschiedenen Modifikationen auf, und zwar in einer in kaltem Wasser leicht löslichen und in einer darin unlöslichen Form, und lassen sich dieselben in anscheinbar unbegrenzter Anzahl von Wiederholungen in einander überführen. Wenn eine Lösung von Ovomukoïd stark in Wärme concentrirt wird, so bilden sich nach Abdampfen des meisten Wassers an der Oberfläche und den Rändern des Gefässes durchsichtige Häute, die sich nicht wieder auflösen, wenn sie mit der übrigen Flüssigkeit vermischt werden. Gegen Ende der Concentrirung erstarrt die Masse zu einem durchsichtigen, in Wasser unlöslichen Gelé, das nach weiterer Austrocknung klar durchsichtige, gelbliche, spröde Lamellen bildet, die zwar in kaltem Wasser schwellen, sich aber nicht darin auflösen. Wird aber das Gelé resp. die Lamellen in kochendes Wasser gebracht, so löst es sich nach einigem Kochen vollständig auf und diese Lösung verhält sich in Allem wie die ursprüngliche. Diese Procedur lässt sich vielmals mit demselben Erfolg wiederholen.

Von den eben angeführten, verschiedenen Darstellungsarten des Ovomukoïds gibt nur die Methode Nr. 2 ein Präparat der löslichen Modifikation, alle anderen geben in kaltem Wasser unlösliche Präparate, die aber, wie bereits betont, mit Leichtigkeit in lösliche Form und zwar durch Behandlung mit kochendem Wasser gebracht werden können.

Die wichtigsten qualitativen Verhältnisse, die einer Lösung des Ovomukoïds (= Pseudopeptons) zukommen, sind schon von Neumeister angegeben worden und werden in von mir complettirtem Zustand angeführt.

1. Physikalische Eigenschaften. Lösung fast farblos (sehr concentrirte Lösung hell gelbbraun); beim Schütteln stark schäumend; nicht fadenziehend oder in erheblichem Grade dickflüssig. Bei langsamer Eintrocknung gummiartig klebend.

2. Fällbarkeitsverhältnisse. Säuren. Salpetersäure, Salzsäure, Schwefelsäure, Metaphosphorsäure, Phosphormolybdänsäure, Essigsäure, Pikrinsäure und Citronensäure, sei es in grösseren oder kleineren Mengen — geben keinen Niederschlag. Wird dagegen von Phosphorwolframsäure und Gerbsäure gefällt.

Metallsalze. Zinnchlorür, neutr. Bleiacetat, Bleiessig, Kupfersulphat, Silbernitrat, Quecksilberchlorid, Quecksilberchlorid + Salzsäure, Quecksilberjodid-Jodkalium, Quecksilberjodid-Jodkalium + Salzsäure, Millon's Reagens, Eisenchlorid (sauer und neutralisirt), Ferrocyankalium + Essigsäure oder Salzsäure, Zinkchlorid + Salzsäure und Alaun — fällen nicht. Niederschlag wird von Bleiessig + Ammon bewirkt.

Neutralsalze.

Bei	Sättigung	mit	Chlornatrium	in Zimmerwärme	— keine	Fällung.
»	»	»	»	bei +30° C.	— »	»
»	»	»	»	im Kochen	— »	»
»	»	»	Natriumsulphat	in Zimmerwärme	— »	»
»	»	»	»	bei +30° C.	— »	»
»	»	»	»	im Kochen	— vollständ.	»
»	»	»	Magnesiumsulphat	in Zimmerwärme	— keine	»
»	»	»	»	bei +30° C.	— »	»[1]
»	»	»	»	im Kochen	— vollständ.	»

[1]) Oder höchst unvollständige Fällung.

Wenn ein wenig Säure, z. B. Essigsäure, Salpetersäure zu der mit Natriumsulphat oder Magnesiumsulphat in Zimmerwärme gesättigten Lösung hinzugefügt wird, so entsteht reichlicher Niederschlag; die mit Chlornatrium (in Zimmerwärme, bei 30° C. oder im Kochen) gesättigte Lösung bleibt dagegen klar auch beim Zusatz von mehr oder weniger Säure.

Zusatz von gleichem Volum gesättigter Ammoniumsulphatlösung bewirkt keinen Niederschlag, wohl aber 2 Volume davon, obgleich die Fällung nicht vollständig ist. Bei Sättigung mit Ammoniumsulphat in Substanz — vollständige Fällung.

Die Niederschläge, welche also bei Sättigung mit Neutralsalzen, allein oder mit Zusatz von Säure, entstehen können, sind beim Verdünnen mit Wasser alle leichtlöslich, ausser denen im Kochen erhaltenen.

3. Färbungsreactionen. Bei Ausführung der Xantoproteïnsäure- und Millon'schen Reaction wird die Flüssigkeit stark orange- resp. rothgefärbt, zeigt aber keine Fällung oder Niederschlag.

Die Biuretreaction fällt deutlich aus; hinsichtlich der Nüance der Färbung (auch bei geringem Kupferzusatz vorwiegend blau) mehr übereinstimmend mit der, welche den gewöhnlichen Eiweisskörpern und den Mucinsubstanzen angehört, als der mehr röthlichen der Peptone und Albumosen.

Die Färbungsreactionen mit concentrirter Salzsäure und Adamciewic's Reagenz fallen dagegen negativ aus (nur bräunliche Färbung).

Dass eine Proteïnsubstanz vorliegt, ist also offenbar, welche sind aber die Verhältnisse, die mich dazu berechtigen, Neumeister gegenüber ihre Eiweissnatur zu verneinen und dieselbe zur Gruppe der Mucinsubstanzen hinzuführen? Theils erzeugt das Ovomukoïd beim Kochen mit verdünnter Salzsäure eine reducirende Substanz in reichlicher Menge, theils besitzt es einen Stickstoffgehalt von nur 12,65 %.

Stickstoff- und Schwefelbestimmungen ergaben folgende Werthe:

Auf aschefreier Substanz %.[1])	Präp. 1.	Präp. 2.	Präp. 3.	Präp. 4.	Präp. 5.	Präp. 6.	Mittelwerth.
Stickstoff . . .	12,59	12,38	12,34	12,73	12,66	12,48	12,65
Schwefel[2]) . . .	2,18	2,20	2,19	—	—	2,25	2,20

Der Gehalt des Schwefels ist also besonders hoch (2,20 %) und der Schwefel befindet sich, wie Versuche mit alkalischer Bleilösung erwiesen, wesentlich in lose gebundenem Zustand.

Um eine Vorstellung vom Ovomukoïdgehalt des Hühnereiweisses zu erhalten, verfuhr ich folgendermassen:

Vom filtrirten Hühnereiweiss wurden abgewogen:

a) 10 Gr., die eingetrocknet wurden, wonach der Rest gewogen, eingeäschert und die Menge der Asche bestimmt wurde. Hierdurch erhielt man Kenntniss über den Gehalt organischer Trockensubstanz.

b) 50 Gr., die nach der Verdünnung mit Wasser unter Zusatz von Essigsäure in Wärme coagulirt wurden. Die Coageln wurden ausgepresst und in destillirtem Wasser ausgewässert, wonach $^{9}/_{10}$[3]) der gesammelten, filtrirten Flüssigkeit im Wasserbad bis zur Trockenheit in einer Porzellanschale abgedampft wurden. Der Rest wurde ein paar Tage lang mit dest. Wasser ausgewässert, in eine Platinaschale übergeführt, gewogen und eingeäschert. Nach Abzug der Asche ergab der Rest die Menge des Ovomukoids.

Nach diesem Verfahren wurden vier verschiedene Partien Hühnereiweiss analysirt (I—IV):

I. a) Organische Trockensubstanz (in 10 Gr. Eiweiss) . . 1,160 Gr.
b) Ovomukoïd (in $^{9}/_{10}$ von 50 Gr. Eiweiss = 0,651 Gr.); also in 10 Gr. Eiweiss . . . . 0,145 »

[1]) Der Aschengehalt wechselte zwischen 1,60 und 2,48 %.

[2]) In den Schwefelbestimmungen wurden Substanzmengen von 1,503 bis 1,728 Gr. angewendet.

[3]) Bei dem übriggebliebenen $^{1}/_{10}$ überzeugte ich mich vermittelst Heller's Probe, dass alles coagulabele Eiweiss entfernt war.

II. a) Organische Trockensubstanz (in 10 Gr. Eiweiss) . . . 1,210 Gr.
b) Ovomukoïd (in $^9/_{10}$ von 50 Gr. Eiweiss = 0,688 Gr.); also in 10 Gr. Eiweiss . . . . 0,153 »

III. a) Organische Trockensubstanz (in 10 Gr. Eiweiss) . . . 1,089 »
b) Ovomukoïd (in $^9/_{10}$ von 50 Gr. Eiweiss = 0,626 Gr.); also in 10 Gr. Eiweiss . . . . 0,139 »

IV. a) Organische Trockensubstanz (in 10 Gr. Eiweiss) . . . 1,186 »
b) Ovomukoïd (in $^9/_{10}$ von 50 Gr. Eiweiss = 0,652 Gr); also in 10 Gr. Eiweiss . . . . 0,145 »

Hieraus ergeben sich folgende Werthe von organischer Trockensubstanz resp. Ovomukoid für den Gehalt des natürlichen Hühnereiweiss:

Organische Trockensubstanz. %.	Ovomukoïd. %.	Relation des Ovomukoïds: organische Trockensubstanz.
11,60	1,45	1 : 8,0
12,10	1,53	1 : 7,9
10,89	1,39	1 : 7,8
11,86	1,45	1 : 8,2

Das Ovomukoid ist also der organische Bestandtheil des Hühnereiweiss, der in Bezug auf die Menge nach dem Ovalbumin den ersten Platz einnimmt. Besonders muss betont werden, dass es darin bedeutend die Globulinsubstanz des Hühnereiweiss übertrifft, deren Menge nach Dillner's[1]) Bestimmungen nur etwa 0,75 % in dem natürlichen Hühnereiweiss beträgt.

Durch das Nachweisen einer Mukoïdsubstanz im Hühnereiweiss hat eine von Hofmeister[2]) ausgesprochene Vermuthung Bestätigung erhalten. Hofmeister erhielt nämlich bei der Analyse des Ovalbumin, das er in krystallinischem Zustand aus dem Hühnereiweiss darstellte, Ziffern, die wesentlich von einem nach Starke's Methode dargestellten Ovalbumin abweichen: 1,09 % Schwefel anstatt 1,93 % und 53,28 % Kohlenstoff anstatt 52,25 % und äussert in Folge dessen: «Die Reinigung des Eiweiss durch Umkrystallisiren scheint sonach mit

[1]) Upsala Läkareförenings Förhandlingar, Bd. 20, S. 199.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 16, S. 187 (1892).

der Entfernung eines relativ kohlenstoffärmeren aber sehr schwefelreichen Körpers einherzugehen».

Um eine richtige Auffassung der elementaren Zusammensetzung des *Ovalbumin* zu erhalten, ist es natürlich absolut nothwendig, auf diese Mukoidsubstanz Rücksicht zu nehmen, um sie mit geeigneten Mitteln zu entfernen, was bisher, da man in völliger Unkenntniss ihres Vorhandenseins lebte, nur selten und dann nur durch einen Zufall der Fall sein konnte.

Ueber die Einwirkung von eiweissverdauenden Fermenten auf die Nucleïnstoffe.

Von

Dr. med. P. M. Popoff,

Assistent des Herrn Prof. Sacharjin zu Moskau.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 14. October 1893.)

Bei der Betrachtung der wichtigen Rolle, welche die Nucleïnstoffe als Bestandtheile jugendlicher Gewebselemente spielen, drängt sich die Frage auf, ob die Nucleïnsäure als solche dem thierischen Organismus zugeführt werden könne, oder ob in allen Fällen, wo neue Gewebe entstehen, diese organische Verbindung aus ihren Elementen aufgebaut werden müsse. Es knüpft sich hieran die praktische Frage, ob man durch Zufuhr dieser organischen Phosphorverbindung dem Organismus irgend welche Vortheile zu bieten vermag.

Der erste Schritt zur Lösung dieser Frage ist das Studium der Einwirkung von Verdauungsflüssigkeiten auf nucleïnhaltige organische Theile; werden die organischen Phosphorverbindungen als solche gelöst, so dürfen wir annehmen, dass sie auch in unzersetztem Zustande resorbirt werden können.

Ich habe demgemäss auf Veranlassung von Herrn Prof. A. Kossel einige Untersuchungen über die Löslichkeit des Nucleïns in verschiedenen Verdauungsflüssigkeiten angestellt.

Nach den früheren Beobachtungen sollte man annehmen, dass die Nucleïnstoffe, welche mit der Nahrung eingeführt

werden, den verdauenden Mitteln einen energischen Widerstand entgegensetzen. Miescher entdeckte das Nucleïn in dem Rückstand, welcher bei der Verdauung der Eiterkörperchen durch Pepsinsalzsäure ungelöst bleibt. In Folge dessen wurde die Resistenz der Nucleïne gegen dieses Agens vielfach für die Darstellung dieser Substanzen benutzt, z. B. von Hoppe-Seyler, A. Kossel, Geoghegan, v. Jaksch, Lubavin. Da nun durch die neueren Untersuchungen erwiesen ist, dass die verschiedenen Nucleïne in ihren Löslichkeitsverhältnissen nicht ganz übereinstimmen, so schien ein erneutes Studium dieser Körper zu Pepsinsalzsäure wünschenswerth. Besonders schien dies wünschenswerth wegen der neuen Gesichtspunkte, die durch die Entdeckung des eigenthümlichen Verhaltens der Nucleïnsäure zu Eiweiss (Altmann) in die Chemie der Nucleïnstoffe hineingetragen sind.

Ich habe meine Versuche zunächst mit diesen künstlich dargestellten Verbindungen von Nucleïnsäuren mit Eiweiss angestellt, um zu ermitteln, ob die Nucleïnsäure, wenn sie einem eiweisshaltigen Verdauungsgemisch hinzugefügt wird, als Nucleïn in den Niederschlag hineingeht oder ob sie gelöst bleibt. Für diese Versuche diente ein aus Hefe dargestelltes eiweiss- und peptonfreies Nucleïnsäurepräparat, welches ich von Herrn Prof. Kossel erhielt.

Es ergab sich Folgendes: wenn man zu einer Lösung von Acidalbumin Pepsinsalzsäure und zugleich Nucleïnsäure in wässeriger Lösung oder in festem Zustand hinzufügt und den entstehenden Niederschlag nach längerem oder kürzerem Verweilen im Brütofen abfiltrirt, so befindet sich ein Theil der Nucleïnsäure im Niederschlag, ein anderer Theil in Lösung. Der letztere wird als Eiweissverbindung niederschlagen, wenn man die Lösung neutralisirt.

Von grösserer Wichtigkeit als die Versuche mit künstlichen Gemischen sind diejenigen mit nucleïnreichen Geweben des Thierkörpers. Ich wählte als Untersuchungsobject die Thymusdrüse, da diese in histologischer Hinsicht als ein mit kernreichen Zellen vollgepfropftes Organ, in chemischer Beziehung als ein nucleïnreiches Gewebe betrachtet werden muss.

Wie verhalten sich diese Nucleïnstoffe gegenüber den Verdaungsfermenten? Werden sie gelöst und resorbirt und verlassen sie als unlösliche und für den Stoffwechsel unnütze Stoffe den Darmkanal?

Es war für die Entscheidung dieser Fragen wichtig, sowohl die Pepsin- wie die Pankreasverdauung bezüglich ihrer Einwirkung auf das Drüsengewebe zu prüfen. —

I.

Eine Thymusdrüse des Kalbes wurde fein zerhackt und in drei ungleiche Theile getheilt.

1. Der erste Theil, bestehend aus $^{3}/_{5}$ des Gewichts der ganzen Masse, wurde mit Pepsinsalzsäure eine Stunde der Verdauung unterworfen, filtrirt und sowohl im Filtrat wie im Rückstand die Phosphorsäure nach dem Veraschen mit Soda und Salpeter bestimmt. Der Rückstand mit Alkohol und Aether extrahirt enthielt 2,56 % P (bezogen auf die bei 100 getrocknete Substanz); da das Gewicht des Rückstandes 35,5 gr. betrug, so waren in demselben 0,89 gr. P enthalten. Das Filtrat enthielt im Ganzen 0,243 gr. P. Es war also nicht viel mehr als der vierte Theil des Phosphors der Thymusdrüse in Lösung gegangen.

2. Der zweite Theil, bestehend aus $^{1}/_{5}$ des Gewichts der Thymusdrüse, wurde nach zweistündiger Verdauung in gleicher Weise untersucht. Der Procentgehalt des ungelösten Theils an Phosphor betrug 2,66; es war also durch die fortgesetzte Verdauung der Nucleïn- resp. Nucleïnsäuregehalt des Rückstandes ein grösserer geworden. Die Gesammtmenge des im Rückstand (6,406 gr. trocken) enthaltenen Phosphors betrug 0,177 gr.

3. Der dritte Theil (ebenfalls $^{1}/_{5}$ der ganzen Drüse) wurde vier Stunden mit Pepsinsalzsäure digerirt. Der Procentgehalt des ungelösten Theils an Phosphor war wiederum gestiegen, er betrug in diesem Falle 2,9; somit war dieser Rückstand durch die fortgesetzte Verdauung noch weiterhin von solchen Stoffen befreit worden, welche keinen oder wenig

Phosphor enthalten; der Nucleïngehalt war also relativ grösser geworden. Die Menge des im Rückstand vorhandenen Phosphors betrug 0,13 gr.

Der erste Verdauungsversuch ergibt, dass etwa der vierte Theil des gesammten Phosphors durch einstündige Verdauung in Lösung gebracht war. Es war für unsere Fragestellung wichtig, zu wissen, wie viel von diesem in Lösung befindlichen Phosphor in Form von Nucleïn resp. Nucleïnsäure und wie viel in Form anderer Verbindungen, z. B. phosphorsaurer Salze, vorhanden sei. Um dies zu erfahren, versuchte ich in den Verdauungslösungen von 2 und 3 eine Bestimmung der Nucleïnphosphorsäure auszuführen. Eine genau gemessene Menge des Filtrates (200 cbcm.) wurde mit Gerbsäure versetzt, um die Nucleïne niederzuschlagen, der Niederschlag möglichst sorgfältig ausgewaschen, mit Soda und Salpeter verascht und zur Phosphorbestimmung verarbeitet. Es ergab sich in beiden Fällen 0,002 Phosphor in Form der Nucleïnphosphorsäure. Wenn auch die angewandte Methode für die Bestimmung des Nucleïns durch Fällung mit Gerbsäure und durch Ermittelung des P-Gehaltes im Gerbsäure-Niederschlag in diesem Fall keinen Anspruch auf grosse Genauigkeit machen kann, so ist doch mit Sicherheit festgestellt, dass in diesen Versuchen ein sehr geringer Theil der in den Organen enthaltenen Nucleïnstoffe als solche in Lösung gehen.

Zu ähnlichen Resultaten führte ein zweiter Versuch mit dem Gewebe der Thymusdrüse. Auch hier waren trotz mehrstündiger Pepsinverdauung nur sehr geringe Mengen von Nucleïn in den Lösungen nachweisbar. Ich fällte grosse Mengen der salzsauren filtrirten Verdauungslösung, welche längere Zeit mit Thymusgewebe digerirt war, durch Gerbsäure aus, konnte aber nicht mehr als Spuren von Nucleïn nachweisen, indem ich den Gerbsäure-Niederschlag veraschte. Auch die Prüfung dieses Niederschlages auf Nucleïnbasen ergab ein negatives Resultat. Meine Versuche über die Einwirkung des Pepsins auf die Nucleïnstoffe stimmen also vollkommen mit den Beobachtungen früherer Forscher (s. auch Bokay[1]) überein.

[1]) Diese Zeitschrift, Bd. I, S. 157.

II.

Zu völlig anderen Resultaten führten nun die Verdauungsversuche mit Pankreasextract. Auch bei diesen Untersuchungen richtete sich mein Augenmerk auf die Entscheidung der Fragen: 1. Ob überhaupt Nucleïnstoffe durch Pankreasextract in Lösung übergeführt werden und 2. ob dieselben in unzersetztem Zustand in der Lösung nachweisbar sind.

Versuchsreihe A.

Für diese Versuchsreihe diente eine Thymusdrüse, welche 24,4 % Trockengewicht und 0,616 % P (auf wasserhaltiges Gewebe berechnet) enthielt. Das benutzte Pankreasextract enthielt 2,17 % Trockenrückstand, 100 cbcm. des Extract enthielten 0,063 gr. P. Auch in dieser Versuchsreihe wurden Versuche mit einstündiger (1), zweistündiger (2) und vierstündiger (3) Verdauung angestellt.

1. 100 gr. fein zerhacktes Thymusgewebe werden bei schwach alkalischer Reaction mit 500 cbcm. Pankreasextract unter Zusatz von Thymol eine Stunde im Brütofen digerirt, sodann filtrirt; sobald 30 cbcm. des Filtrates abgelaufen sind, werden diese eingedampft, der Rückstand getrocknet, gewogen und zur Phosphorbestimmung mit Soda und Salpeter verascht. Dieselben ergaben 1,253 gr. feste Bestandtheile, darin 0,036 gr. P. Somit befanden sich in der ganzen Lösung 0,60 gr. P., von denen 0,315 gr. auf den Phosphorgehalt der angewandten Pankreasflüssigkeit zu beziehen sind. Von den in 100 gr. Thymusdrüsen enthaltenen 0,616 gr. P. sind also nach einstündiger Pankreasverdauung bereits 0,285 gr., d. h. fast die Hälfte in Lösung übergeführt. In dieser Lösung ist der Phosphor zum grossen Theil als unveränderte Nucleïnphosphorsäure enthalten. Das wird durch folgende Versuche bewiesen.

400 cbcm. des Filtrates werden mit Gerbsäure ausgefällt, der Niederschlag wog getrocknet 28,821 gr. Ein Theil des Niederschlags (26,821 gr.) wurde durch Kochen mit Schwefelsäure zerlegt und auf Nucleïnbasen verarbeitet, ich erhielt 0,294 gr. einer Mischung von Adenin und Hypoxanthin. Ein-

kleiner Theil (2 gr.) des Niederschlages ergab bei der Phosphorbestimmung 0,012 gr. P. Es war somit unzersetzte Nucleïnphosphorsäure in der verdauten Lösung nachgewiesen.

2. Nach zweistündiger Verdauung im Brütofen war die Menge der in Lösung befindlichen Phosphorsäure fast die gleiche, ebenso konnte aus 400 cbcm. der Lösung 33,961 gr. eines Gerbsäureniederschlages gewonnen werden. Ein Theil (31,961 gr.) dieses Niederschlages gab 0,229 Mischung von Adenin und Hypoxanthin, ein anderer Theil (2 gr.) gab 0,0108 gr. P. Man hätte erwarten sollen, dass die Menge der in Lösung befindlichen Nucleïnstoffe nach zweistündiger Verdauung grösser sei, während sie in diesen Versuchen sich als geringer erweist. Es ist dies ein Versuchsfehler, den ich bisher nicht vermeiden konnte. Die Filtration der Lösungen ist eine langsame, während derselben schreitet die Verdauung fort, somit ist die Angabe der Verdauungszeit bei diesen Versuchen eine illusorische.

Versuchsreihe B.

Man könnte der Versuchsreihe A den Vorwurf machen, dass in der Pankreasflüssigkeit Nucleïn vorhanden sei und dass die gefundene Nucleïnsäure von diesem herrühre. Ich stellte daher eine zweite Versuchsreihe mit einer Lösung von Pankreatin an, bei welcher dieser Einwand ausgeschlossen war. Ich benutzte Pankreatin von Witte, dessen Lösung (1 : 1000) nach dem Veraschen nur unwägbare Spuren von Phosphorsäure gab. Die zu diesen Versuchen benutzte Thymusdrüse enthielt 0,62 % P (auf feuchtes Gewebe bezogen) und 24,64 % Trockensubstanz. Die Versuche wurden ebenso wie in Versuchsreihe A Angestellt:

1. Nach einstündiger Verdauung im Brütofen enthielt das Filtrat 0,20 gr. P, also etwa ein Drittel des gesammten in der Drüse vorhandenen Phosphors. Die Gesammtmenge des durch Gerbsäure fällbaren Niederschlages betrug 30 gr., die Menge des in dem Gerbsäure-Niederschlag enthaltenen Phosphors 0,10964 gr. Somit war die Hälfte des in Lösung befindlichen Phosphors nachweisbar in dem Nucleïn enthalten.

2 Nach zweistündiger Verdauung betrug die Menge des im Filtrat vorhandenen Phosphors 0,25 gr., davon entfallen 0,13 gr. auf Nucleïnsäure. An Nucleïnbasen wurden aus dem Gerbsäure-Niederschlag 0,098 gr. erhalten.

Wir müssen aus diesen Versuchen schliessen, dass die Lösung der Nucleïnstoffe nur in sehr geringer Menge im Magen, in beträchtlicher Masse hingegen im Darm durch die Einwirkung des Pankreassaftes erfolgt. Hierbei werden die Nucleïnstoffe als solche in Lösung übergeführt, es ist also anzunehmen, dass sie auch als solche resorbirt werden. Ueber die Intensität dieser Resorption können natürlich die vorliegenden Versuche keinen Aufschluss geben, die Aufklärung dieser Frage muss vielmehr den Stoffwechsel-Versuchen vorbehalten bleiben, welche zur Zeit im hiesigen Laboratorium ausgeführt werden[1]). In gleicher Richtung wie die Trypsin-Verdauung dürfte auch die Darmfäulniss auf die Nucleïnstoffe einwirken. Wir dürfen annehmen, dass die verschiedenartigen Nucleïne unter dem Einfluss der Vorgänge im Darmkanal auch ein verschiedenes Verhalten zeigen. In zarten jugendlichen Geweben wird die Auflösung der Nucleïne eine fast vollständige sein, in derberen älteren Producten hingegen widersteht ein Theil dieser Stoffe bekanntlich hartnäckig der Einwirkung alkalischer Lösungsmittel und es ist ferner bekannt, dass die Fäces bedeutende Mengen dieser phosphorhaltigen Producte enthalten. Jedenfalls müssen wir aber aus unseren Versuchen den Schluss ziehen, dass diese wichtigen phosphorhaltigen Baustoffe den resorbirenden Apparaten des Organismus in gelöster Form dargeboten werden und dass alle Bedingungen zu einer Resorption unzersetzter Nucleïne gegeben sind.

Zum Schluss sage ich Herrn Prof. A. Kossel meinen wärmsten Dank für seine jederzeit bewiesene liebenswürdige Förderung und Unterstützung. Ebenso danke ich seinem Assistenten Herrn Dr. Krüger.

---

[1]) Siehe diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 508.

Ueber die Verbreitung der Nucleïnbasen in den thierischen Organen.

Von

Dr. Yoshito Inoko[1],
a. o. Professor an der Universität Tokio.
(Mitgetheilt von A. Kossel.)

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 14. October 1893.)

Die Basen, welche aus den Nucleïnen hervorgehen, sind ihrer Constitution nach in zwei Gruppen zu trennen. Die in manchen Lehrbüchern noch verbreiteten Angaben über die Bildung von Hypoxanthin aus Xanthin oder von Xanthin aus Hypoxanthin beruhen, wie A. Kossel[2]) und E. Fischer[3]) erwiesen haben, auf irrthümlichen Angaben, nach den letzten aus dem hiesigen Laboratorium hervorgegangenen Untersuchungen von M. Krüger, welche die Constitution des Hypoxanthins und Adenins aufklären, ist es auch verständlich, dass ein solcher Uebergang nicht ganz leicht stattfinden kann. Wir haben also zwei getrennte Reihen von Basen, von denen die einen (Xanthin und Guanin) in dieser Ab-

---

[1]) Herr Professor Dr. Inoko wurde uns vor Abschluss der geplanten Untersuchungen durch einen plötzlichen Tod entrissen. Wir beklagen in ihm einen begabten und zielbewussten Fachgenossen. Durch die Veröffentlichung dieser Analysen erfülle ich einen von dem Verstorbenen kurz vor seinem Tode geäusserten Wunsch. A. Kossel.

[2]) Diese Zeitschr., Bd. 6, S. 428.

[3]) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 17, S. 329.

handlung als Xanthinbasen[1]), die anderen (Hypoxanthin oder Sarkin und Adenin) als Sarkinbasen bezeichnet werden sollen.

Die Untersuchung über die Verbreitung der Nucleïnbasen in den verschiedenen Organen des Körpers ist der erste Schritt zur Erkenntniss ihrer physiologischen Rolle. Bei dieser Untersuchung kann man zwei verschiedene Gesichtspunkte verfolgen. Entweder man sucht diejenigen Bedingungen zu präcisiren, unter denen in der Xanthin- wie in der Sarkinreihe die Loslösung der NH-Gruppe und ihre Ersetzung durch O, also der Uebergang von Adenin und Guanin in Hypoxanthin und Xanthin erfolgt. Oder man sucht den Unterschied in der Verbreitung der Xanthinreihe gegenüber der Sarkinreihe klarzustellen. Lässt sich bei einer dieser Reihen eine bestimmte Beziehung zu physiologischen, entwicklungsgeschichtlichen oder pathologischen Zuständen der thierischen Organe nachweisen?

Dies waren die Fragen, deren Lösung Herr Inoko in Angriff nahm. Es war ihm nur kurze Zeit vergönnt, sich dieser Aufgabe zu widmen, desshalb konnten seine Arbeiten auf die erwähnten Fragen noch keine Antwort geben. Sie müssen aber als Vorarbeiten für die Untersuchung dieser wichtigen Probleme geschätzt werden.

Herr Inoko versuchte zunächst zu entscheiden, ob in dem gleichen Gebilde — den Spermatozoen — verschiedener Thiere die gleichen quantitativen Verhältnisse bezüglich dieser Basen vorhanden sind. Es wurden die Spermatozoen des Stiers, des Lachses und des Ebers in den Kreis der Untersuchungen gezogen. Die quantitative Trennung der Basen erfolgte nach den im hiesigen Laboratorium ausgearbeiteten Methoden und zwar die Trennung von Adenin und Hypoxanthin vom Guanin durch Ammoniak (bei Wasserbadtemperatur), die Trennung des Adenins vom Hypoxanthin durch Pikrinsäure. Zur Bestimmung des Hypoxanthins diente das Hypoxanthinsilberpikrat. Zur Abtrennung der genannten drei

[1]) Mit dem Namen «Xanthinbasen» müssten natürlich auch die übrigen Derivate des Xanthins, nämlich Theobromin, Theophyllin und Caffeïn bezeichnet werden.

Basen vom Xanthin wurden in bekannter Weise die Löslichkeitsverhältnisse der Silberverbindungen in Salpetersäure benutzt.

Sperma des Stiers.

15 gr. lufttrocknen Spermas lieferten: 0,1033 gr. Xanthinsilber, d. i. 0,0409 gr. Xanthin, 0,0288 gr. Guanin; 0.0333 gr. Adeninpikrat, d. i. 0,0147 gr. Adenin; 0,0873 gr. Hypoxanthinpikrat, d. i. 0,0240 gr. Hypoyanthin; 1,1269 gr. Sperma enthielt 0,8728 gr. Trockensubstanz (110°), d. i. 77,45 %.

Spermatozoen des Ebers. Die Spermatozoen wurden gewonnen durch Schütteln der zerschnittenen Nebenhoden des Ebers mit Wasser. Die wässerige Aufschwemmung wurde durch Gaze colirt, die colirte Flüssigkeit mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt und centrifugirt, sodann mit Alkohol und Aether extrahirt.

5,942 gr. der lufttrockenen Spermatozoen lieferten: 0,2836 gr. Xanthinsilber, d. i. 0,1124 gr. Xanthin; 0,0102 gr. Guanin; 0,1708 gr. Adeninpikrat, d. i. 0,0645 gr. Adenin; 0,1212 gr. Hypoxanthinsilberpikrat, d. i. 0,0347 gr. Hypoxanthin.

0,2209 gr. Spermatozoen gaben 0,2031 gr. Trockenrückstand, d. i. 91,94 %.

Spermatozoen des Lachses. Diese Spermatozoenmasse wurde aus den Hoden des Lachses in gleicher Weise gewonnen wie die des Ebers. Die beiden Präparate wurden zu verschiedenen Zeiten dargestellt und mit Alkohol und Aether ausgezogen.

Präparat I.

6,664 gr. Spermatozoenmasse lieferten: 0,4356 gr. Xanthinsilber, d. i. 0,1727 gr. Xanthin, 0,0075 gr. Guanin, 0,2652 gr. Adeninpikrat, d. i. 0,0996 gr. Adenin, 0,1403 gr. Hypoxanthinsilberpikrat, d. i. 0,0392 gr. Hypoxanthin.

1,664 gr. Spermatozoen ergaben 1,4753 gr. Trockensubstanz, d. i. 88,46 %.

Präparat II.

4,6503 gr. Spermatozoen lieferten: 0,4591 gr. Xanthinsilber, d. i. 0,1820 gr. Xanthin, 0,0090 gr. Guanin, 0,2972 gr. Adeninpikrat, d. i. 0,1114 gr. Adenin, 0,1999 gr. Hypoxanthinsilberpikrat, d. i. 0,0562 gr. Hypoxanthin.

Im Anschluss an diese Analysen untersuchte Herr Inoko noch ein Präparat von nucleïnsaurem Baryt, welches ich aus den Stierhoden dargestellt hatte. Dasselbe gab keine Biuret-

reaction beim Erwärmen mit Natronlauge und Kupfersulfat, war also frei von Eiweiss.

0,8561 gr. des bei 110° getrockneten nucleïnsauren Baryts lieferten: 0,1305 gr. Xanthinsilber, d. i. 0,0517 gr. Xanthin, kein Guanin, 0,0138 gr. Adeninpikrat, d. h. 0,0063 gr. Adenin, 0,0606 gr. Hypoxanthinsilberpikrat, d. i· 0,0168 gr. Hypoxanthin.

Weitere Analysen wurden an dem Pankreas des Rindes ausgeführt.

400 gr. feuchte Pankreassubstanz lieferten: 2,0240 gr. Xanthinsilber, d. i. 0,8024 gr. Xanthin, kein Guanin, 0,1165 gr. Adeninpikrat, d. i. 0,0456 gr. Adenin, 0,5862 gr. Hypoxanthinsilberpikrat, d. i. 0,1668 gr. Hypoxanthin.

9,1196 gr. feuchte Pankreassubstanz lieferten nach dem Trocknen bei 110° 2,4729 gr. Rückstand, d. i. 27,12 %.

Die Resultate dieser Analysen sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Untersuchtes Organ.	Procente bezogen auf das trockene Organ.				Verhältniss der Sarkinbasen zu den Xanthinbasen. Letztere = 1.	Verhältniss der Imidbasen (Adenin und Guanin) zu den sauerstoffreicheren Basen (Hypoxanthin und Xanthin. Letztere = 1.
	Xanthin.	Guanin.	Hypoxanthin.	Adenin.		
Sperma des Stiers .	0,3521	0,2479	0,2066	0,1265	0,55 : 1	0,67 : 1
Nucleïnsäuren aus Stierhoden	6,0390	-	1,9624	0,7359	0,45 : 1	0.09 : 1
Sperma des Ebers .	2,0574	0,1867	0,6352	1,1806	0,89 : 1	0,51 : 1
Sperma des Lachses Nr. I	2,9236	0,1270	0,6636	1,6861	0,77 : 1	0,50 : 1
Sperma des Lachses Nr. II.	3,9137	0,1935	1,2085	2,3955	0,88 : 1	0,50 : 1
Pankreas	0,7397	—	0,1538	0,0420	0,27 : 1	(0,05 : 1)

Aus der Tabelle ergibt sich folgendes:

1. In den untersuchten Organen sind die Xanthinbasen in grösserer Menge vorhanden als die Sarkinbasen, das Verhältniss beider unter einander ist ein wechselndes.

2. Die Menge der sauerstoffreicheren Basen (Hypoxanthin und Xanthin) überwiegt in den genannten Organen über die

der stickstoffreicheren (Adenin und Guanin). In den Spermatozoen des Lachses und des Ebers erweist sich das Verhältniss als ein constantes (2 : 1). In den Spermatozoen des Stiers beträgt es 3 : 2, völlig anders ist es in dem aus der Hodensubstanz des Stiers dargestellten Nucleïnsäurepräparat. Ich werde auf die Erklärung dieses Unterschiedes in einer späteren Abhandlung zurückkommen. In dem Pankreas beginnt sehr bald nach dem Tode eine Umwandlung des Adenins und Guanins in Hypoxanthin und Xanthin; da die Pankreasdrüse nicht unmittelbar nach dem Tode des Thiers untersucht war, können die hier gefundenen Zahlen in Bezug auf diese Frage nicht als massgebend betrachtet werden.

Nach den Untersuchungen von Schindler[1]) gibt es Organe, in welchen nur geringe Mengen oder gar keine Xanthinbasen neben viel Sarkinbasen vorkommen, nämlich die Thymusdrüse und die Spermatozoen des Karpfens. Diese Untersuchungen sind von Schindler zu einer Zeit angestellt worden, wo die Methoden zur Trennung der Nucleïnbasen noch unvollkommene waren. Herr Inoko hat daher die Untersuchung an den Leukocyten der Thymusdrüse wiederholt und überhaupt keine Xanthinbasen, sondern nur reichliche Mengen von Sarkinbasen besonders von Adenin gefunden. In der That gibt auch die aus der Thymusdrüse dargestellte Nucleïnsäure, wie ich demnächst ausführlich darthun werde, nur Adenin, keine Xanthinbasen. Organe, welche keine Sarkinbasen, wohl aber Xanthinbasen enthalten, sind bisher noch nicht bekannt.

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XIII, S. 432.

Ueber den Nachweis von Gallenfarbstoffen im Harne.

Von

Dr. Adolf Jolles in Wien.

(Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium von Dr. Max und Dr. Adolf Jolles in Wien.)

(Der Redaction zugegangen am 20. October 1893.)

Die physiologisch-chemische Literatur zeigt an Arbeiten über den Nachweis von Gallenfarbstoffen im Harn einen grossen Reichthum und noch immer werden Vorschläge zur Auffindung dieser Gallenbestandtheile im Harne gemacht, wie die vor Kurzem publicirten Methoden von O. Rosenbach[1]) und H. Rosin[2]) beweisen.

Rosenbach hat bekanntlich bereits im Jahre 1876 eine beachtenswerthe Modification der Gmelin'schen Gallenfarbstoffprobe empfohlen, und man musste annehmen, dass die neuerdings empfohlene Probe sich durch grössere Empfindlichkeit auszeichnet.

Rosin bezeichnet in der citirten Abhandlung seine Probe als «eine sehr empfindliche», ohne jedoch darüber Aufschluss zu geben, ob die älteren bekannten Proben an Empfindlichkeit der seinigen nachstehen und inwieweit diese die Grenze der Empfindlichkeit zu erweitern geeignet ist.

Leider finden wir in der Literatur überhaupt fast gar keine positiven Daten über die Empfindlichkeit der Proben.

---

[1]) Deutsche, medicinische Wochenschrift, 1892, Nr. 17.

[2]) Berliner klin. Wochenschrift, 1893, S. 106.

Ich machte es mir daher zur Aufgabe, die zahlreichen, bisher in Vorschlag gebrachten Methoden auf ihre Empfindlichkeit und Eignung zum Nachweise von Gallenfarbstoffen im Harne zu prüfen.

Zu diesem Zwecke habe ich die bisher in Vorschlag gebrachten Proben auf ihre Empfindlichkeit geprüft, indem ich zu abgemessenen Mengen normalen Harnes abgemessene Mengen frischer Ochsengalle hinzufügte.

Alle Versuche sind ceteris paribus unter den gleichen Bedingungen durchgeführt und auch der verwendete normale Harn von denselben Personen — den Assistenten des Laboratoriums — entnommen worden.

Die im Maximum zugefügte Gallenmenge betrug 10 %, d. h. zu je 100 cbcm. normalen Harn wurden stets 10 cbcm.

Empfindlichkeits-

Gallenfarbstoff. = Proben.			Literatur.
1.	Gmelin'sche Probe.	Ueberschichtung eines icterischen Harnes mit Salpetersäure.	
2.	Modification von Brücke.	Zusatz verdünnter ausgekochter Salpetersäure und dann conc. Schwefelsäure.	Siehe in Anleitung zur Harnanalyse von F. Loebisch, II. Auflage, S. 338.
3.	Modification von Vitali.	Hinzufügen einiger Tropfen Kaliumnitritlösung und hierauf etwas verdünnter Schwefelsäure.	Jahresbericht über die Fortschritte der Thierchemie 1873, S. 149.
4.	Modification von Masset.	M. wendet statt Nitritlösung festes Salz an, das er jedoch erst nach erfolgtem Zusetzen der Schwefelsäure zu dem Harne hinzufügt.	Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. 19, S. 255.
5.	Modification von Fleischl.	Nach F. wird der Harn mit dem gleichen Volumen einer concentrirten Lösung von salpetrigsaurem Natron vermischt und concentrirte Schwefelsäure — ohne zu mischen — mit einer Pipette auf dem Boden des Reagensglases gebracht.	Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. 15, S. 502.

Ochsengalle hinzugefügt, dann der Harn sorgfältig umgeschüttelt und mit demselben die Proben durchgeführt.

Die Verwendung von grösseren Gallenmengen habe ich aus dem Grunde für überflüssig erachtet, weil Proben, die im Harne mit 10 % Galle den entsprechenden Gallenfarbstoff-Gehalt nicht sicher nachweisen lassen, die Bezeichnung als «Gallenfarbstoffprobe» nicht mehr verdienen.

Zur Prüfung der Proben wurde stets auf je 100 cbcm. normalen Harn 10, 7,5, 5, 4, 3, 2, 1,5, 1 cbcm. frische Ochsengalle zugefügt und mit diesen gallenfarbstoffhaltigen Harnen die einzelnen Proben durchgeführt.

Bei jeder Probe sind 3 Controlproben gemacht worden.

Die nachstehende Tabelle gibt die relative Empfindlichkeitsgrenze der erwähnten Gallenfarbstoffproben an.

Tabelle.

10 %.	7,5 %.	5 %.	4 %.	3 %.	2 %.	1,5 %.	1 %.	0,5 %.
positiv	positiv	noch positiv	negativ	—	—	—	—	—
positiv	noch positiv	negativ	—	—	—	—	—	—
positiv	noch positiv	negativ	—	—	—	—	—	—
positiv	negativ		—	—	—	—	—	—
positiv	noch positiv	negativ	—	—	—	—	—	—

	Gallenfarbstoff: = Proben.		Literatur.
6.	Modification von Rosenbach.	Man filtrirt den Harn und prüft auf der Innenseite mit salpetrige Säure enthaltender Salpetersäure.	Centralblatt für die medicin. Wissenschaften 1876, S. 5.
7.	Modification von Dragendorff.	Statt des Filters nach Rosenbach schlägt D. eine poröse Thonplatte vor.	Siehe Deubner's vergleichende Untersuchung über die neueren Methoden zum Nachweise des Gallenfarbstoffes im Harne Icterischer. Inaugural-Dissertation 1875. Dorpat.
8.	Probe von Ultzmann.	10 cbcm. Harn werden mit 3—4 cbcm. Kalilauge (1 : 3) umgeschüttelt und mit reiner Salzsäure übersättigt.	Wiener medicin. Presse Nr. 32, 1877.
9.	Probe von Maréchal.	Man fügt 2 oder 3 Tropfen Jodtinctur in einen sauren oder neutralen Harn — es resultirt eine smaragdgrüne Farbe.	Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. 8, 1869.
10.	Probe von Smith.	Anstatt zu mischen, schlug W. G. Smith vor, einige Tropfen Jodtinctur vorsichtig auf den Harn fliessen zu lassen, wobei die Grenzschicht sich schön grün färbt.	Durch: Analyse des Harnes von Neubauer und Vogl, VIII. Auflage, bearbeitet von Huppert, S. 152.
11.	Probe von Gerhard.	G. schüttelt den Chloroformauszug des icterischen Harns mit sehr verdünnter Jodjodkaliumlösung, wobei nur so wenig Jod verwendet werden darf, dass sich das Chloroform kaum roth färbt; setzt man etwas Kalilauge hinzu, so entfärbt sich das Chloroform und die Kalilauge wird grün.	Sitzungsberichte der Würzburger physikalisch-medicinischen Gesellschaft Nr. 2.
12.	Probe von Rosin.	Man füllt etwas von dem zu untersuchenden Harn in ein Reagensglas und giesst etwa 2—3 cbcm. verdünnte Jodtinctur so vorsichtig in das ganz schräg gehaltene Reagensglas, welches den Harn enthält, dass die verdünnte Jodtinctur den Harn überschichtet. Sofort oder nach einer Minute tritt an der Grenzschicht zwischen Harn und Jodtinctur ein grasgrüner Ring auf.	Berliner klinische Wochenschrift 1893, S. 106.

10 %.	7,5 %.	5 %.	4 %.	3 %.	2 %.	1,5 %.	1 %.	0,5 %.
positiv	positiv	noch positiv	negativ	—	—	—	—	—
positiv	noch positiv	negativ	—	—	—	—	—	—
negativ	—	—	—	—	—	—	—	—
positiv	positiv	negativ	—	—	—	—	—	—
positiv	positiv	positiv	positiv	noch positiv	negativ	—	—	—
kaum wahrnehmbar	negativ	—	—	—	—	—	—	—
positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	noch positiv	negativ	—	—

	Gallenfarbstoff: = Proben.		Literatur.
13.	Probe von H. Capranica.	Man versetzt den Harn nach vorangegangener Ansäuerung mit Aether und Chloroform (1 : 1), decantirt und prüft dann die Farbenreactionen durch Zusatz von Brom. Bei Gegenwart von Gallenfarbstoffen smaragdgrüne Farbe.	Deutsche medic[illegible] Zeitung 1883. Durch: Pharm[illegible] ceutische Centr[illegible] halle, Bd. XXI[illegible] S. 456.
14.	Probe von Rosenbach.	Durch vorsichtigen Zusatz einiger Tropfen einer 5 procentigen Chromsäure-Lösung soll sich gallenfarbstoffhaltiger Harn grün färben. Mehrzusatz ist zu vermeiden, da sich sonst die Flüssigkeit braunroth färbt.	Deutsche medicin[illegible]sche Wochenschrift 1892, S. 1[illegible]
15.	Probe von Huppert.	8—10 cbcm. Harn werden mit Kalkmilch gefällt, der Niederschlag abfiltrirt, mit schwefelsäurehaltigem Alkohol in ein Reagensglas gekühlt und die saure Flüssigkeit, in der der Niederschlag enthalten ist, zum Sieden erhitzt. Bei Gegenwart von Gallenfarbstoff nimmt die Flüssigkeit eine grüne bis blaue Farbe an.	Archiv für Heil[illegible]kunde, Bd. 8, S. 35[illegible] und 476, 1887.
16.	Probe von Hoppe-Seyler.	Der Harn wird mit Kalkmilch gefällt, Kohlensäure zur Ausfällung des Kalkes eingeleitet, der Niederschlag abfiltrirt und mit Wasser gewaschen. Lässt man zum Kalkmilchniederschlag auf den Filter mässig verdünnte salpetrige Säure enthaltende Salpetersäure fliessen, so entsteht die bekannte Farbenskala.	Handbuch der physikal. und patholog.-chem. Analyse von Felix Hoppe-Seyler 1893, S. 229.
17.	Probe von Hilger.	Man versetzt den gelinde erwärmten Harn mit $Ba(OH)_2$ bis zur alkalischen Reaction. Der abfiltrirte Niederschlag wird ausgewaschen und dann zu einer kleinen Probe des Niederschlages salpetrige Säure enthaltende Salpetersäure zugesetzt. Bei Gegenwart von Gallenfarbstoffen sollen die bekannten Farbenreactionen entstehen.	Archiv der Pharmacie. Durch: Pharmaceut. Centralhalle, Bd. XVII. S. 377.
18.	Probe von Lewin.	L. schlägt vor, den Harn zur Ausscheidung von harnsauren Salzen stark abzukühlen, letztere nach dem Sammeln auf einem Filter und Auswaschen in heissem Wasser zu lösen und mit dieser Lösung die Reaction anzustellen.	Centralblatt für die medicinische Wissenschaft 1875. S. 81.

10 %.	7,5 %.	5 %.	4 %.	3 %.	2 %.	1,5 %.	1 %.	0,5 %.
negativ	—	—	—	—	—	—	—	—
negativ	—	—	—	—	—	—	—	—
positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	noch positiv	negativ	—	—
positiv	positiv	positiv	positiv	noch positiv	negativ	—	—	—
positiv	positiv	positiv	positiv	noch positiv	negativ	—	—	—
negativ	—	—	—	—	—	—	—	—

	Gallenfarbstoff: = Proben.		Literatur.
19.	Probe von Ehrlich.	Der Harn wird mit dem gleichen Volumen verdünnter Essigsäure versetzt, und dann tropfenweise folgendes Reagens hinzugefügt, das im Liter enthält: 1 gr. Sulfanilsäure, 15 cbcm. Salzsäure und 0,1 gr. Natriumnitrit. Die entstehende dunkle Farbe geht auf Zusatz von Säure, am besten von Eisessig, in das für die Anwesenheit von Bilirubin charakteristische Violett über.	Centralblatt für kli nische Medicin 4, S. 721, 1883, und Charité - Annalen 11, S. 139, 1886.
20.	Chloroform-Probe und hierauf Salpetersäure - Niederschlag.	Ausschüttelung des gallenfarbstoffhaltigen Harnes mit Chloroform und Ueberschichtung der Chloroformlösung mit Salpersäure, die etwas salpetrige Säure enthält.	

Fassen wir die Ergebnisse der Tabelle ins Auge, so resultirt zunächst, dass eine Reihe von Gallenfarbstoffproben nicht einmal in mit 10 °/₀ Galle versetzten Harnen den Gallenfarbstoff nachzuweisen vermögen.

Hierher gehören die Proben von: Ultzmann, Capranica, Lewin, Ehrlich und Rosenbach.

Mit der Probe des Letzteren ist, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, die vor Kurzem in Vorschlag gebrachte Chromsäureprobe gemeint, welche jedoch als zu wenig empfindlich ausserhalb der Reihe der Gallenfarbstoffproben zu setzen ist.

Auffallenderweise wird diese unzuverlässige Probe zum Nachweis von Gallenfarbstoffen im Harne in dem neuesten Leitfaden von Lenhartz[1]) vorgeschlagen.

Die unterste Grenze der bekanntesten und wohl am meisten angewendeten Probe von Gmelin liegt bei 5 °/₀, d. h. mit anderen Worten: Wenn wir die 24stündige Harnmenge mit 1500 cbcm. annehmen, so kann in dieser Menge

[1]) Mikroscopie und Chemie am Krankenbett von H. Lenhartz Berlin 1893. Verlag von Julius Springer.

%.	7,5 %.	5 %.	4 %.	3 %.	2 %.	1,5 %.	1 %.	0,5 %.
ativ	—	—	—	—	—	—	—	—
itiv	Farbenringe kaum sichtbar.	negativ	—	—	—	—	—	—

so viel Gallenfarbstoff enthalten sein, als in 60 cbcm. reiner Galle, trotzdem sind wir mittelst der Gmelin'schen Probe nicht im Stande, diesen Gallenfarbstoffgehalt zu constatiren.

Interessant ist, dass die vorgeschlagenen Modificationen der Gmelin'schen Probe, nämlich die von Brücke, Vitali, Masset, Fleischl und Draggendorff weniger empfindlich sind, als die ursprüngliche Probe von Gmelin. Nur die wegen ihrer bequemen Ausführung beachtenswerthe Rosenbach'sche Modification hat dieselbe Empfindlichkeitsgrenze wie die Gmelin'sche Probe; nichtsdestoweniger gehört sie — wie die Tabelle zeigt — ebenfalls in die Reihe der wenig empfindlichen Proben.

Weiterhin geht aus der Tabelle hervor, dass die Smith'sche Probe, auf die neuerdings Rosin aufmerksam gemacht hat, ihre unterste Grenze bei 3 % hat. Dieselbe Empfindlichkeitsgrenze hat also auch die sogenannte Rosin'sche Modification, ferner die Hoppe-Seyler- und Hilger'sche Probe. Demnach verdient die von Rosin empfohlene Probe keineswegs das Prädicat «äusserst empfindlich».

Sie steht an Empfindlichkeit sogar der Huppert'schen Probe nach, die unter den bisher vorgeschlagenen Proben als die empfindlichste bezeichnet werden muss. Ihre unterste Grenze liegt bei 2 ‰, d. h. es kann in der Harnausscheidung pro die — letztere mit 1500 cbcm. angenommen — so viel Gallenfarbstoff enthalten sein, als in 22,5 cbcm. reiner Ochsengalle vorhanden ist, und wir sind mittelst dieser empfindlichsten Probe nicht im Stande, diesen Gehalt an Gallenfarbstoff mit Sicherheit zu constatiren.

Diese Thatsache veranlasste mich nun, eine Reihe von Versuchen zu dem Zwecke anzustellen, um eine Probe ausfindig zu machen, vermöge welcher auch in Harnen mit unter 0,1 % Galle der entsprechende Gallenfarbstoffgehalt constatirt werden kann.

Zwei Momente waren es, die bei den Versuchen insbesondere berücksichtigt werden mussten:

1. Die möglichst vollständige Isolirung des in der Harnprobe enthaltenen Gallenfarbstoffes.

2. Die Fällung des isolirten Gallenfarbstoffes auf einer möglichst kleinen Fläche, resp. in einem möglichst kleinen Volumen.

Dass Chloroform den Gallenfarbstoff aus dem Harne aufnimmt, ist eine bekannte Thatsache. Aber vergleichende Untersuchungen haben ergeben, dass beim kräftigen Schütteln einer Harnprobe mit Chloroform nur ein verhältnissmässig geringer Theil des Gallenfarbstoffes extrahirt wird, und dass verhältnissmässig bedeutende Chloroformmengen — in mehreren Portionen — erforderlich sind, um aus einer Harnprobe den Gallenfarbstoff möglichst vollständig zu extrahiren.

Gleichzeitig haben vergleichende Untersuchungen ergeben, dass durch Combination von Extraction und Fällung, d. h. durch Behandlung einer Harnprobe mit Chloroform und einem geeigneten Fällungsmittel der Gallenfarbstoff unter gleichen Verhältnissen am vollständigsten aus dem Harn extrahirt wird.

Wie die Huppert'sche und Hilger'sche Probe beweist, sind Kalk- und Barytwasser ganz geeignete Fällungsmittel;

ür unsere Zwecke konnte jedoch die Kalkmilch, ebensowenig vie das Barythydrat in Betracht kommen, weil die durch liese Reagentien im Harne hervorgerufenen Niederschläge zu oluminös sind. Auch die gleichzeitige Verwendung von Chlorbaryum und Schwefelsäure, welche als gute Fällungsmittel für Gallenfarbstoff bezeichnet werden können, erwies sich wegen ler zu umfangreichen Niederschlagsmenge als unzweckmässig. Hingegen hat sich der blosse Zusatz von Chlorbaryum in eder Hinsicht bewährt.

Meine Versuche lehrten, dass man, wenn Harn — und zwar am besten 50 cbcm. — nach vorangegangener Ansäuerung mit einigen Tropfen verd. Salzsäure, mit Chlorbaryum in geringem Ueberschuss und dann mit Chloroform — ca. 5 cbcm. — versetzt und hierauf 3—4 Minuten kräftig geschüttelt wird, das Maximum an Gallenfarbstoff dem zu prüfenden Harne durch das Chloroform und den Niederschlag zu entziehen vermag. Ueberdies ist der Niederschlag verhältnissmässig gering, nachdem nur die präformirte Schwefelsäure gefällt wird. Wird das Chloroform und der Niederschlag abpippetirt, filtrirt und auf die Innenfläche des Filters einige Tropfen Salpetersäure getropft — also kurz die Rosenbach'sche Reaction ausgeführt —, so entstehen die bekannten Farben-Reactionen und zwar je weiter dem engeren Ende des Filters zu, desto schöner.

Die unterste Grenze dieses Verfahrens liegt bei 1 ‰ oder mit anderen Worten: wir haben durch unser Verfahren die Rosenbach'sche Reaction, deren unterste Grenze bei 5 ‰ liegt, bis auf 1 ‰ empfindlicher gestaltet.

Aber dieses Ergebniss befriedigte mich noch nicht, und zwar führte ich die noch nicht hinreichende Empfindlichkeit der Probe darauf zurück, dass der Gallenfarbstoff noch immer in einem zu grossen Volumen vertheilt ist und überdies auf dem Filter die Salpetersäure auf eine verhältnissmässig sehr geringe Gallenfarbstoffmenge einwirkt. Auch unsere Ueberschichtungsversuche mit Jodtinctur haben kein befriedigendes Ergebniss geliefert. Wir sind aus diesem Grunde in der Weise vorgegangen, dass wir das Chloroform und den Niederschlag

in ein Reagensglas abpippetirt und das letztere in ein Wasserbad von einer Temperatur von ca. 70 bis 80° hineingestellt haben.

Bereits nach 5 bis 10 Minuten ist das Chloroform verdunstet, worauf dann das Reagensglas herausgenommen und ca. 5 Minuten ruhig zum Abkühlen stehen gelassen wird. Nach dieser Zeit hat sich der Niederschlag am Boden zusammengeballt, so dass die überstehende Flüssigkeit leicht abgegossen werden kann. Der Niederschlag am Boden des Reagensglases ist selbst bei 0,1 °/₀ sehr deutlich gelb gefärbt.

Lässt man nun längs der Glaswand des Reagensglases 2 bis 3 Tropfen einer conc. Salpetersäure, die zu etwa ¹/₃ rauchende Salpetersäure enthält, hinunterfliessen, dann beobachtet man sofort oder nach einer Minute am Boden des Gefässes die bekannten Gallenfarbstoff-Reactionen in geradezu prachtvoller Weise, wobei auch die gelbe Farbe des Niederschlages deutlich von den Farbenringen hervortritt.

Diese Probe ist derart empfindlich, dass selbst in Harnen mit 0,2 °/₀ Galle die Farbenringe — und darunter der charakteristische grüne und blaue Ring — sehr deutlich wahrzunehmen sind. Um in Harnen, die weniger als 0,2 °/₀ Galle enthalten, den Gallenfarbstoff constatiren zu können, ist es erforderlich, 100 cbcm. Harn und 10 cbcm. Chloroform in Verwendung zu nehmen und, wie angegeben, die Probe durchzuführen. Man kann auf diese Weise 0,1 °/₀ mit vollster Sicherheit nachweisen. Somit wäre unsere Probe etwa 20 Mal empfindlicher als die Huppert'sche Probe, die unter den bisherigen Proben als die empfindlichste zu bezeichnen ist. Wir empfehlen somit zum Nachweis von Gallenfarbstoffen im Harne obige sehr empfindliche Probe in folgender Ausführung:

In einem mit einem Glasstöpsel versehenen Glascylinder (ca. 25 cm. Höhe und 3 cm. Durchmesser) fügt man zu 50 cbcm. Harn einige Tropfen verdünnter HCl (10 °/₀), Chlorbaryum im Ueberschuss und 5 cbcm. reines Chloroform und schüttelt die Lösung mehrere Minuten kräftig durch. Alsdann lässt man den Cylinder etwa 10 Minuten stehen, wobei sich das Chloroform und der Niederschlag zu Boden setzen.

Sollten Theile des Niederschlages noch im Harne suspendirt sein, was namentlich bei zähflüssigen Harnen zuweilen der Fall ist, so genügt es, den Cylinder langsam einigemal hin und her zu bewegen, um den gesammten Niederschlag zu Boden zu bringen.

Nunmehr pippetirt man das Chloroform und den Niederschlag in ein Reagensglas ab. Die geringe Harnmenge, die dabei ebenfalls abpippetirt wird, ist für die Probe ohne Belang.

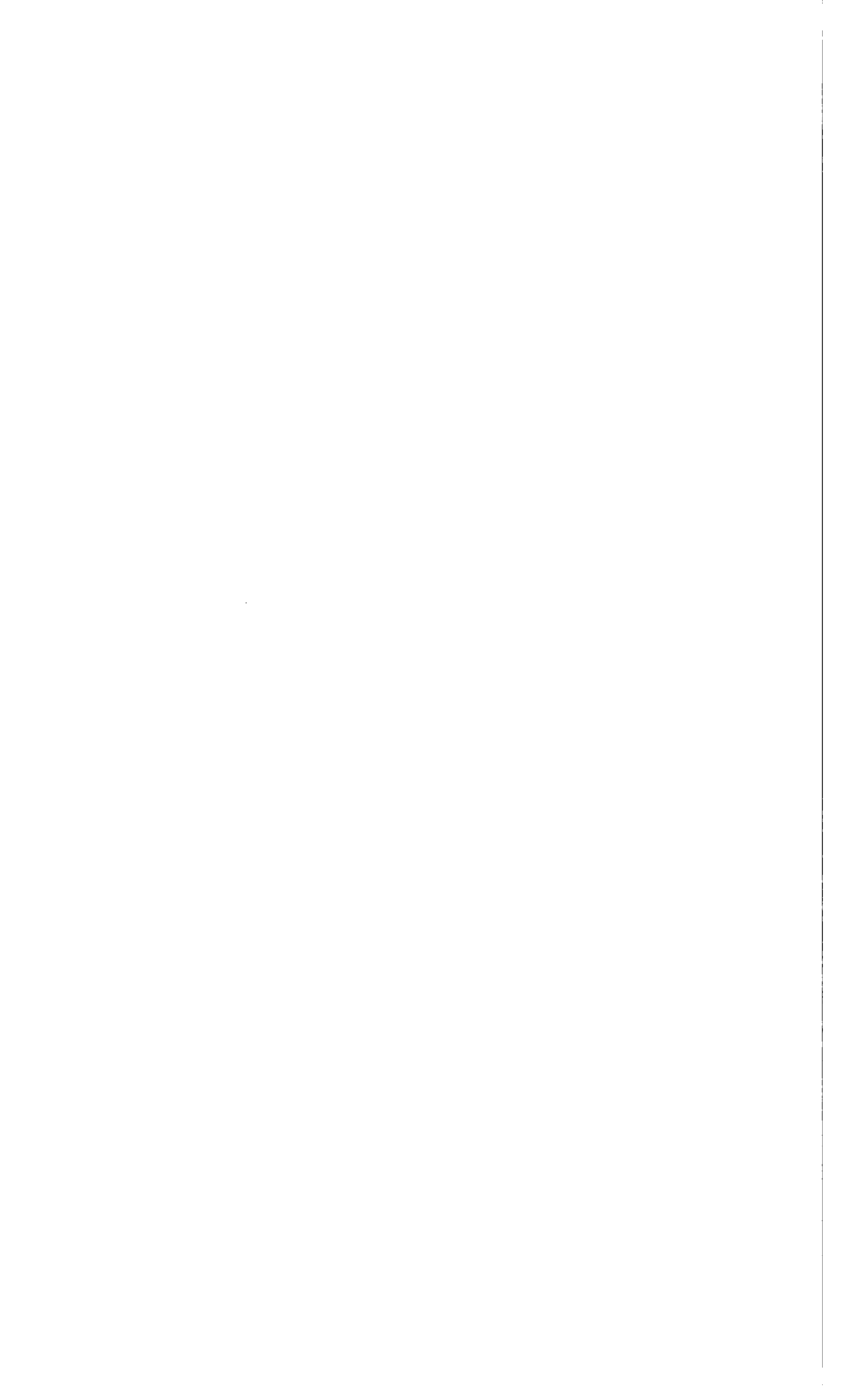
Das Reagensglas bringt man in ein Wasserbad, welches auf ca. 80° erhitzt ist.

Bei dieser Temperatur ist in 5 bis 10 Minuten das gesammte Chloroform verdampft. Hierauf lässt man das Reagensglas für einige Minuten bei Zimmertemperatur stehen, wobei sich der Niederschlag am Boden des Gefässes zusammenballt, und sich von der überstehenden Flüssigkeit derart trennt, dass letztere leicht abgegossen werden kann.

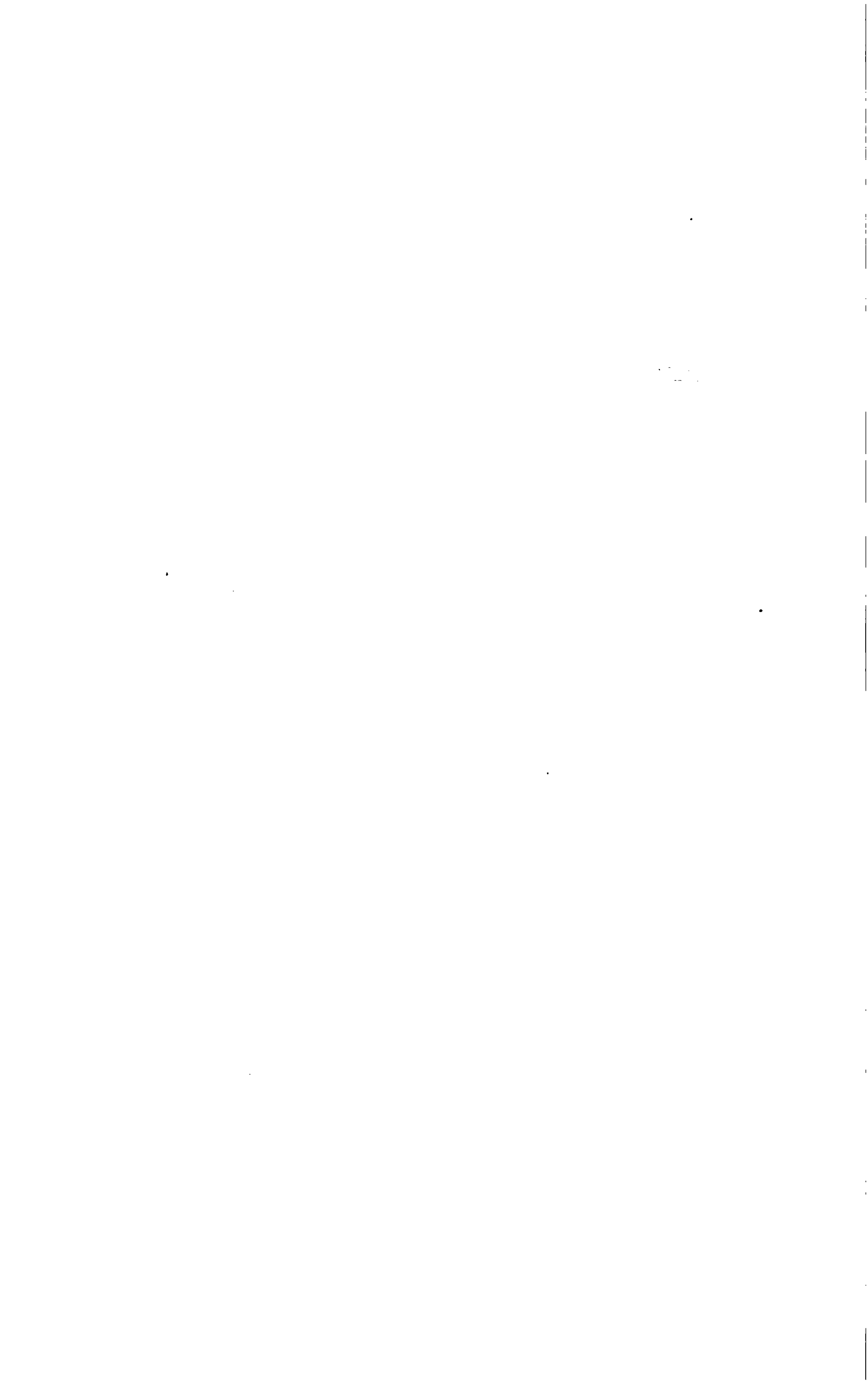
Der Niederschlag ist, wie schon erwähnt, selbst bei 0,1 % Galle noch deutlich gefärbt.

Lässt man nun längs der Glaswandung 3 Tropfen einer conc. Salpetersäure, welcher rauchende Salpetersäure — etwa $^1/_3$ — zugesetzt wurde, herunterfliessen, dann entstehen sofort oder nach einer Minute am Boden des Gefässes die für Gallenfarbstoff charakteristischen Farbringe, so dass selbst bei 0,2 % Galle der charakteristische grüne und blaue Ring noch deutlich zu sehen ist.

Bei Verwendung von 100 cbcm. Harn kann noch bei 0,1 % Galle mit Sicherheit der Gallenfarbstoffgehalt constatirt werden.











PRINTED
IN
U.S.A.



